

Herstellung, Charakterisierung und Verarbeitung des neuartigen Spinnenseidenproteins MaSp1s

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

- DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN -

im Promotionsprogramm „Molekulare Biowissenschaften“

der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik

und Naturwissenschaften der Universität Bayreuth

(BayNAT)

vorgelegt von

CHRISTOPHER THAMM

(Master of Science)

geboren in Bayreuth

Bayreuth 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis Mai 2017 in Bayreuth am Lehrstuhl Biomaterialien unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheibel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 23.11.2017

Zulassung durch das Leitungsgremium: 04.12.2017

Wissenschaftliches Kolloquium: 16.05.2018

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Thomas Scheibel (Gutachter)

Prof. Dr. Stefan Heidmann (Gutachter)

Prof. Dr. Birte Höcker (Vorsitz)

Prof. Dr. Stefan Geimer

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 SEIDE	1
1.2 NATÜRLICHE SPINNENSEIDE	1
1.2.1 SEIDENARTEN	2
1.2.2 DRAGLINE (MAJOR AMPULLATE) SEIDE	5
1.2.2.1 AUFBAU	5
1.2.2.2 TERMINALE DOMÄNEN	8
1.2.3 NATÜRLICHER SPINNPROZESS	14
1.2.4 MOLEKULARE STRUKTUR & MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN	16
1.2.5 MASp1s	19
1.3 REKOMBINANTE SPINNENSEIDE	22
1.3.1 HERSTELLUNGSSTRATEGIE	22
1.3.2 VERARBEITUNG	26
1.3.2.1 FASERHERSTELLUNG DURCH NASSSPINNEN	26
1.3.2.2 HYDROGELE	28
1.4 ZIELSETZUNG	30
2. SYNOPSIS	32
2.1. HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON eMASp1s	34
2.2. PRODUKTION UND UNTERSUCHUNG VON eMASp1s SEIDENFASERN	37
2.3. ANALYSE UND VERARBEITUNG VON eMASp1s HYDROGELEN	42
3. LITERATURVERZEICHNIS	46
4. PUBLIKATIONSLISTE	65
5. DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS	66
6. TEILARBEITEN	67

6.1. TEILARBEIT I	69
6.2. TEILARBEIT II.....	83
6.3. TEILARBEIT III	97
6.4. TEILARBEIT IV	121
DANKSAGUNG.....	129
VERSICHERUNGEN UND ERKLÄRUNGEN	130

ZUSAMMENFASSUNG

Seit Jahrhunderten kennen und nutzen einige Naturvölker natürliche Spinnenseide als Material mit herausragender Mechanik, Bioverträglichkeit und Bioabbaubarkeit. Von den bis zu sechs verschiedenen Spinnenseidenarten, die von weiblichen Vertretern der echten Radnetzspinnen in dafür spezialisierten Drüsen produziert werden können, ist die *Dragline*-Seide in den letzten Jahren in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Diese Seidenart bildet sowohl den Rahmen als auch die Speichen des Radnetzes. Die zugrundeliegenden Proteine werden *Major Ampullate* Spidroin 1 und 2 (MaSp1, MaSp2) genannt, wobei sich MaSp1 und MaSp2 hauptsächlich im Prolingehalt unterscheiden.

Alle bislang beschriebenen und charakterisierten MaSp Proteine besitzen ein Molekulargewicht zwischen 200 und 350 kDa mit einer aus bis zu 100 Wiederholungseinheiten bestehenden repetitiven Kerndomäne, welche von nicht-repetitiven und über unterschiedliche Spinnen- und Seidenarten stark konservierten terminalen Domänen flankiert wird.

Im Jahr 2013 wurde ein neuartiges Spinnenseidenprotein aus *Cyrtophora moluccensis* beschrieben, was durch die Anwesenheit der typischen Aminosäure-Sequenzmotive (poly-A, GGX) und das Fehlen von Prolin eindeutig den MaSp1 Proteinen zugeordnet werden konnte. Allerdings ist dieses Protein lediglich ca. 40 kDa groß, besitzt keine repetitive Kerndomäne, jedoch viele geladene Aminosäuren, womit es von der Grundstruktur der meisten bekannten MaSp Proteinen deutlich abweicht und MaSp1 short (MaSp1s) genannt wurde. Lediglich die flankierenden terminalen Domänen sind in Übereinstimmung mit den meisten bekannten MaSp Proteinen in konservierter Form vorhanden.

Um einen Eindruck vom Aufbau, den Eigenschaften und einer möglichen Anwendbarkeit von MaSp1s zu bekommen, war es das Ziel dieser Arbeit, das neuartige Spinnenseidenprotein rekombinant herzustellen, biochemisch zu charakterisieren und auf sein Potential zur Bildung von unterschiedlichen Seidenmorphologien wie Fasern oder Hydrogelen hin zu untersuchen.

Mittels nahtloser Klonierung wurde die MaSp1s Kerndomäne erfolgreich mit den etablierten terminalen Domänen von *Latrodectus hesperus* (Schwarze Witwe) und einem Affinitätstag fusioniert, das Volllängenprotein (engineered MaSp1s, eMaSp1s) durch Genexpression in

E. coli rekombinant hergestellt und anschließend mittels Fällungsreaktionen und Säulenchromatographie gereinigt.

Die Sekundärstrukturanalyse von eMaSp1s in Lösung zeigte den deutlichen Einfluss der helikal gefalteten terminalen Domänen im Vergleich zur unstrukturierten Kerndomäne, und bei der Betrachtung der thermischen und chemischen Stabilität von eMaSp1s dominieren die charakteristischen Merkmale bzw. Übergangspunkte der Termini.

Auf Basis der Experimente und Ergebnisse von Heidebrecht et. al. (2015) an einem anderen Spinnenseidenvolllängenprotein mit beiden Termini (N1L(AQ)₁₂NR3), wurde eMaSp1s auf seine Verspinnbarkeit zu Seidenfasern getestet. Trotz des Vorhandenseins beider terminaler Domänen zeigte eMaSp1s keine auf Selbstassemblierung der C-terminalen Domäne beruhende Phasenseparation. Nach äquimolarer Beimischung von N1L(AQ)₁₂NR3 konnte Phasenseparation beobachtet und eine biomimetische Spinnlösung (BSD) erzielt werden. Die einfache Konzentrierung einer eMaSp1s-Lösung auf ca. 10-12 % (w/v) führte hingegen zu einer klassischen Spinnlösung (CSD).

Mittels Nassspinnverfahren konnten beide Spinnlösungen zu stabilen Fasern versponnen und diese anschließend nachgestreckt werden, wobei ein deutlicher Anstieg der für die Stabilität der Fasern verantwortlichen β -Faltblattbereiche beobachtet werden konnte. Die eMaSp1s-Fasern aus CSD zeigten gute mechanische Eigenschaften, welche sogar denen von N1L(AQ)₁₂NR3 überlegen waren, während die Mischfasern (BSD) eine schlechtere Mechanik aufwiesen. Diese Erkenntnisse wurden für ein Modell zum Verhalten von eMaSp1s während des Spinnprozesses und in der finalen Faser genutzt.

Im letzten Teil der Arbeit konnten durch Selbstassemblierung erfolgreich eMaSp1s-Hydrogele unterschiedlicher Konzentration hergestellt werden, welche scherverdünnendes Verhalten zeigten und damit eine wichtige Voraussetzung zur Verarbeitung mittels Dispensdruck erfüllten. Überraschenderweise zeigte eine Mischung von eMaSp1s und dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) deutlich verbesserte mechanische Eigenschaften im Vergleich zu Hydrogelen aus den einzelnen Proteinen. eMaSp1s und die Mischung wurden mittels Dispensdruck verarbeitet. Nach dem Druck zeigte sich die Mischung aber deutlich weniger formstabil als reine eADF4(C16)-Hydrogele. Allerdings erlangten eMaSp1s-Hydrogele ihre Mechanik nach einigen Tagen zurück, was sie zu potentiellen Kandidaten für Anwendungen z. B. als Wirkstoffdepots macht.

In dieser Arbeit wurde das neuartige Seidenprotein eMaSp1s erstmals erfolgreich rekombinant hergestellt, charakterisiert und verarbeitet. Die Ergebnisse liefern einen ersten Eindruck zu den Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten von eMaSp1s und legen den Grundstein für zukünftige Studien zum Potential des neuartigen Spinnenseidenproteins.

SUMMARY

Natural spider silk shows fascinating characteristics, such as outstanding mechanical properties, biocompatibility and biodegradability. Female orb weaver spiders produce up to six different types of silk in specialized glands. The most prominent silk, the dragline, building the frame and radii of an orb web, mainly consists of two underlying protein classes, major ampullate spidroin 1 and 2 (MaSp1, MaSp2), which differ in proline content.

All MaSp proteins described and characterized so far have a molecular weight between 200 and 350 kDa, showing a highly repetitive core domain consisting of up to 100 repeat units flanked by highly conserved terminal domains.

In 2013, a novel type of spider silk protein was described in *Cyrtophora moluccensis*. This protein shows motifs (poly-A, GGX) typical for MaSp1 proteins. However, the protein is only about 40 kDa in size, lacking a repetitive core domain, but having multiple charged amino acids, clearly deviating from the building principle of most known MaSp proteins. It was named MaSp1 short (MaSp1s) due to its low molecular weight. In accordance to other MaSp proteins, the terminal domains were highly conserved.

The objective of this work was the recombinant production and biochemical analysis of MaSp1s in order to examine its potential for the assembly of different silk morphologies such as fibers or hydrogels.

By seamless cloning, the MaSp1s core domain was fused to the established terminal domains of *Latrodectus hesperus* and an affinity tag and produced by gene expression in *E. coli* followed by precipitation and chromatography purification.

Secondary structure analysis revealed the distinct influence of the helically folded terminal domains in solution in comparison to the unstructured protein core. Thermal and chemical unfolding experiments showed the characteristic transition points previously shown for the terminal domains.

Heidebrecht et. al. performed experiments with another spider silk full length protein containing both terminal domains, N1L(AQ)₁₂NR3, in 2015. Based on the results, eMaSp1s (engineered MaSp1s) was tested for its potential to form stable silk fibers. Despite containing both terminal domains, eMaSp1s showed no phase separation initiated by the C-terminal domain in other constructs. After mixing eMaSp1s and N1L(AQ)₁₂NR3 in an equimolar ratio, a phase separation could be observed and led to a highly concentrated phase that could

be used as a biomimetic spinning dope (BSD). Concentration of eMaSp1s up to 10-12 % (w/v) resulted in a classical spinning dope (CSD).

Using wet-spinning methods, both spinning dopes could be successfully spun into stable silk fibers. After post treatment (stretching), the β -sheet content of the fibers increased, leading to higher fiber stability. eMaSp1s fibers gained from CSD showed impressive mechanical properties superior to those made of N1L(AQ)₁₂NR3 while the mixed fibers (BSD) exhibited weaker mechanics. These findings were the basis for creating a model referring to the behavior of eMaSp1s during the spinning process and in the final silk fiber.

Finally, eMaSp1 hydrogels were successfully produced by self-assembly. The hydrogels shows shear thinning behavior which is an important prerequisite for processing using dispense plotting. Surprisingly, a mixture of eMaSp1s and the recombinant spider silk protein eADF4(C16) showed improved mechanical properties in comparison to hydrogels made of only one single protein. eMaSp1s and the blended hydrogel were processed by dispense plotting but were less form-stable then pure eADF4(C16) hydrogels directly after printing. However, eMaSp1s hydrogels recovered their mechanics over a time period of a few days, making them a candidate for applications such as drug depots.

Taken together in this work, the novel silk protein eMaSp1s was successfully recombinantly produced, characterized and processed into different morphologies. Our results provide first insights into the properties and possible uses of eMaSp1s and are the basis for future studies to fully understand the potential of this new spider silk protein.

1. EINLEITUNG

1.1 SEIDE

Seit etwa 5000 Jahren hat Seide eine magische Wirkung auf den Menschen und war lange Zeit ein Zeichen für besonderen Reichtum und Schönheit.^[1] Nicht umsonst werben internationale Unternehmen auch heutzutage noch mit Begriffen wie „seidig weich“ oder „Seidenglanz“ um die Exklusivität ihrer Textil- oder Kosmetikprodukte zu unterstreichen.

Produziert wird dieser wertvolle und beeindruckende Naturstoff von vielen Vertretern der Insekten (Insecta), Tausendfüßer (Myrapoda) und Spinnentiere (Arachnida), die phylogenetisch allesamt dem Stamm der Gliederfüßer (Arthropoda) zuzurechnen sind.^[2-4] Die ursprünglich wohl bekannteste Seidenart ist die Seide des Seidenspinners *Bombyx mori*, welcher in China schon seit 3000 v. Chr. gezüchtet und zur Herstellung von edlen Stoffen und Kleidung verwendet wird.

In der Literatur sind Seiden grundsätzlich als faserartige Proteine mit hochrepetitiver Aminosäuresequenz definiert, die in einem Tier in flüssiger Form gespeichert und durch Scherkräfte oder Verspinnen in eine stabile Faser umgewandelt werden.^[2] Trotz der Unterschiede auf biochemischer Ebene haben Seiden einige Dinge gemeinsam. Die zugrundeliegende Aminosäuresequenz der Seidenproteine ist reich an Alanin, Serin und Glycin und bildet definierte Sekundärstrukturen wie coiled-coils, β -Faltblätter oder α -Helices aus, welche maßgeblichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften und den Verwendungszweck der jeweiligen Seide haben.^[5-7]

1.2 NATÜRLICHE SPINNENSEIDE

Neben der Seide des Seidenspinners *Bombyx mori* zählt Spinnenseide zu den bekanntesten Seiden und hat aufgrund seiner Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten in der Forschung der letzten Jahre massiv an Bedeutung gewonnen. Aktuell sind weltweit knapp 46.500 Webspinnenarten (Araneae) bekannt, von denen etwa die Hälfte Netze für den Beutefang verwendet.^[8] Je nach Spinnenart und Beutetier haben sich im Laufe der Evolution differenzierte Netzformen wie Baldachin-, Trichter-, Wurf-, Hauben- oder das bekannte Radnetz entwickelt, welches für den Fang von flugfähigen Beutetieren optimiert wurde.^[9-10] Bereits die alten Griechen machten sich die hohe Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit

von Spinnenseide zu Nutzen und verwendeten sie als Auflage für blutende Wunden, während die australischen Ureinwohner Spinnennetze aufgrund ihrer großen Zähigkeit in Verbindung mit hoher Dehnbarkeit als Fischernetze nutzten.^[11-12]

1.2.1 SEIDENARTEN

Die weiblichen Vertreter der echten Radnetzspinnen (Araneidae) wie die europäische Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus*) können in spezifischen Drüsen sechs verschiedene Seidenfaserarten und eine Klebeseide produzieren, welche nach der produzierenden Drüse benannt sind und für verschiedene Anwendungsbereiche wie Netzbau, Einwickeln von Beute oder Schutz der Nachkommen verwendet werden.^[13] Obwohl alle diese Drüsen evolutionär einen gemeinsamen Ursprung haben,^[14] entwickelten sich aufgrund unterschiedlicher Anforderungen im Laufe der Millionen Jahre diverse Seidenarten mit unterschiedlichem Aufbau und verschiedenen Eigenschaften.^[15-18] Fünf dieser Seidenarten werden von der Spinne für den Bau eines Radnetzes verwendet (Abbildung 1).^[19-21]

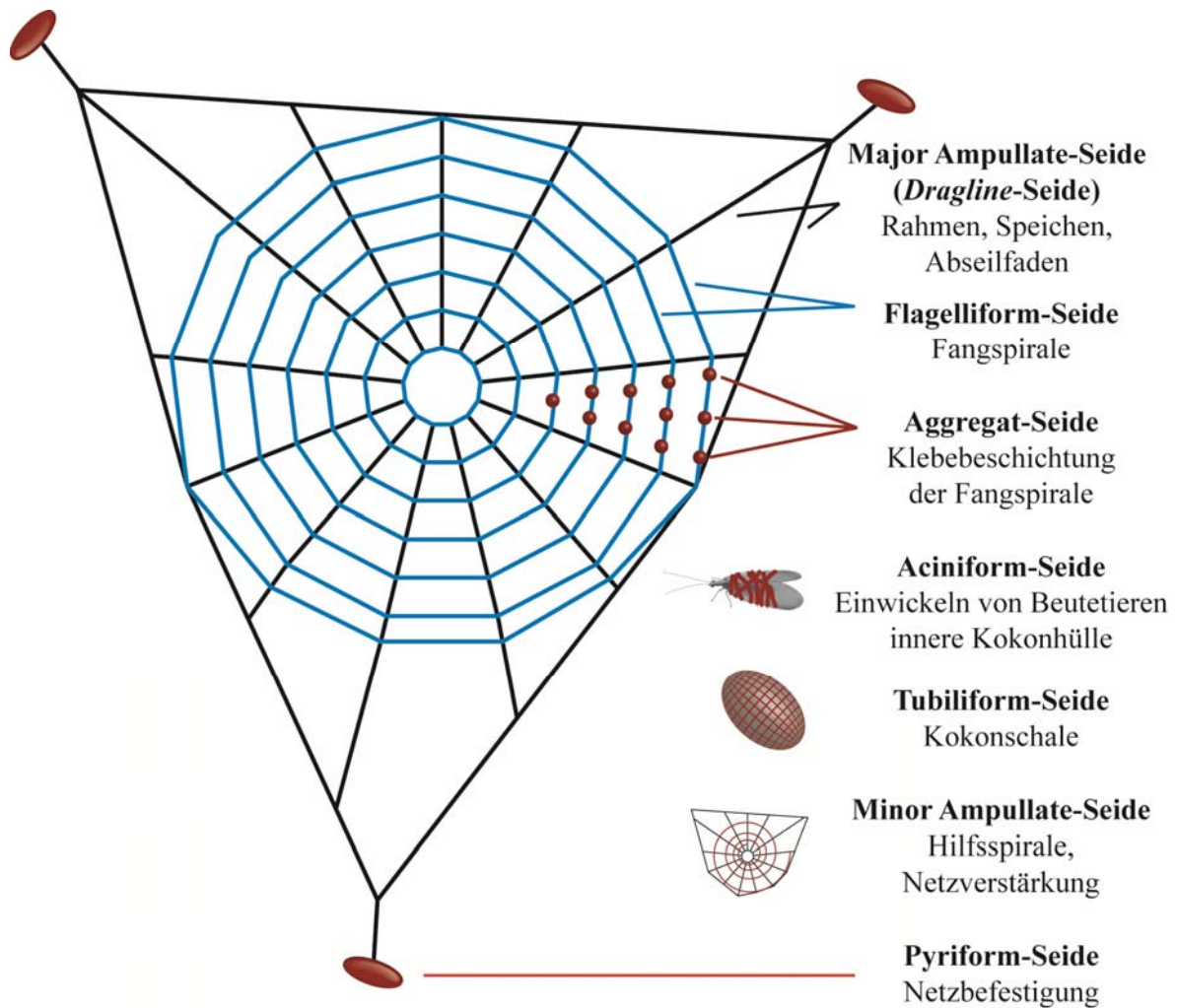


Abbildung 1: Übersicht der sechs verschiedenen Seidenfaserarten und der Klebeseide von Radnetzspinnen, die in spezialisierten Drüsen gebildet werden. Modifiziert nach ^[22] mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier.

Die aufgrund ihrer außerordentlichen Kombination aus Zugfestigkeit und Zähigkeit mechanisch interessanteste und am besten charakterisierte Seidenart ist die *Dragline*-Seide. Insbesondere im Vergleich mit anderen Seidenarten oder synthetischen Fasermaterialien wird die außergewöhnliche Mechanik der *Dragline*-Seide offenbar (Tabelle 1). Die zugrundeliegenden Seidenproteine werden Spidroine genannt und in der großen Ampullendrüse (*Major Ampullate*, MA) gebildet und für den Aufbau des Rahmens und der Speichen des Radnetzes eingesetzt. Zusätzlich verwendet die Spinne die *Dragline*-Seide als Abseil- und permanenten Sicherungsfaden, weshalb natürliche *Dragline*-Seide in großen Mengen durch gleichmäßiges Abziehen von der Spinne gewonnen werden kann.^[23-26]

Tabelle 1: Vergleich der mechanischen Eigenschaften von *Dragline*-Seide mit anderen bekannten Fasermaterialien. Werte entnommen aus ^[23, 27-28].

Material	Steifigkeit [GPa]	Zugfestigkeit [GPa]	Dehnbarkeit [%]	Zähigkeit [MJm ⁻³]
<i>A. diadematus Dragline</i>	10	1,1	27	180
<i>A. diadematus Flagelliform</i>	0,003	0,5	270	150
<i>B. mori</i> Kokonseide	7	0,6	18	70
Kollagen	1,5	0,15	12	7,5
Nylon 6.6	5	0,95	18	80
Kevlar 49	130	3,6	2,7	50
Hochfester Stahl	200	1,5	0,8	6
Karbon	300	4	1,3	25

Während des Netzbaus konstruiert die Spinne als Verstärkung zusätzlich ein stabilisierendes Gerüst aus Seide der kleinen Ampullendrüse (*Minor Ampullate*, MI) welches nach Fertigstellung des Radnetzes teilweise wieder abgebaut wird.^[29-30]

Um die im Falle eines im Netz landenden Beutetieres auftretenden Kräfte ableiten zu können ohne das Netz zu zerstören, ist eine besonders elastische Seidenart nötig. Daher besteht die Fangspirale eines Radnetzes aus *Flagelliform*-Seide, welche bis zu 270 % reversibel gedehnt werden und somit viel Energie aufnehmen kann.^[23, 31-32] Die Fangspirale wird von ecribellaten Spinnenarten (z. B. *Araneus diadematus* oder der schwarzen Witwe *Latrodectus hesperus*) zusätzlich mit einer Klebeschicht aus *Aggregat*-Seide benetzt, um die Beute im Netz zu fixieren und an der Flucht zu hindern. Diese Seide besteht aus einem Gemisch von hygroskopischen Peptiden und klebrigen Glykoproteinen.^[33-35] Cribbelate Spinnenarten (z. B. *Hyptiotes paradoxus*) bedecken ihr Netz im Gegensatz dazu punktuell mit feinsten Seidenfasern, in denen sich die Beute aufgrund von van der Waals-Kräften und hygroskopischen Eigenschaften verfängt.^[36-37]

Zwei weitere Seidenarten werden verwendet, um den Nachwuchs im Spinnenkokon vor Fressfeinden und schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen. *Tubiliform*-Seide (auch *Cylindriform*-Seide genannt) bildet die Kokonschale, während *Aciniform*-Seide die

Kokonhülle von innen auskleidet und außerdem verwendet wird, um Beutetiere einzuwickeln.^[17, 38-40] Die Drüsen zur Produktion von *Tubuliform*-Seide entwickeln sich bei weiblichen Spinnen im Laufe der sexuellen Reifung und die Seide wird ausschließlich zur Fortpflanzungszeit produziert.^[17, 41]

Zur Verknüpfung von MA, MI und *Flagelliform*-Seide dient die *Pyriiform*-Seide, welche primär aber als Befestigungsmaterial für das Radnetz verwendet wird.^[42-43] Die Spinne erzeugt diese Befestigungspunkte durch Einbetten kleiner Fasern in eine gelartige Substanz, welche durch Trocknung aushärtet und das Netz an Oberflächen wie Steinen oder Ästen chemisch fixiert.^[44]

1.2.2 DRAGLINE (MAJOR AMPULLATE) SEIDE

Dragline (MA)-Seide ist die am besten untersuchte Seidenart der Radnetzspinnen. Ihre beeindruckende Zähigkeit, die auf der Kombination aus hoher Dehnbarkeit und Zugfestigkeit beruht, wird von keinem anderen natürlichen oder synthetisch hergestellten Fasermaterial erreicht.^[23] Ein weiteres interessantes Phänomen lässt sich beobachten, sobald MA-Seide nass wird oder die Luftfeuchtigkeit über 60 % ansteigt. Dann schrumpft die Faser bei zunehmendem Durchmesser auf bis zu 50 % ihrer ursprünglichen Länge. Diesen Effekt nennt man Superkontraktion (vgl. Kapitel 1.2.4).^[45-49] All diese Eigenschaften liegen im hierarchischen Aufbau und der zugrundeliegenden molekularen Struktur der MA-Seide begründet.^[5, 50]

1.2.2.1 AUFBAU

Bereits vor Jahrzehnten wurde entdeckt, dass MA-Seidenfasern eine Kern-Mantel-Struktur verschiedener struktureller Ebenen mit spezifischen Funktionen aufweisen (Abbildung 2).^[51-52] Der 150-250 nm dicke Fasermantel besteht aus Lipiden, Glykoproteinen und *Minor Ampullate* (MI)-Seidenproteinen.^[53-54] Aufgrund ihrer relativ schwachen Anhaftung leistet die 10-20 nm dicke Lipidschicht keinen Beitrag zur Stabilität der Fasern, sondern ist wichtig für den Schutz der Faser vor Umwelteinflüssen und dient als Trägerschicht für Pheromone zur Fortpflanzung und Artenerkennung.^[54-55] Die 40-100 nm dicke Glykoproteinschicht ist fester mit dem Kern der Faser verbunden und dient als Schutz vor Austrocknung und Mikroorganismen, während die sich nach innen anschließende 50-100 nm dicke Schicht aus

MI-Seide die Faser vor dem Einfluss von Chemikalien schützt und aufgrund ihrer Plastizität einen Beitrag zur mechanischen Stabilität liefert.^[54, 56]

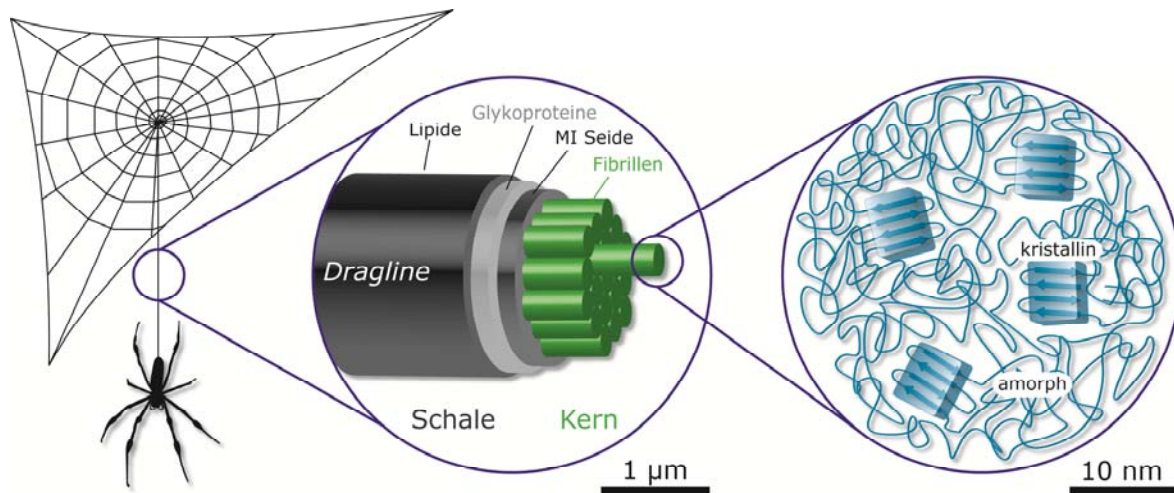


Abbildung 2: Kern-Schale Aufbau der Dragline-Seide. Die Schale der Spinnenseidenfaser besteht aus drei Schichten: *Minor Ampullate*-Seide (MI-Seide), Glykoproteine und Lipide. Der Kernbereich der Faser besteht aus einzelnen Fibrillen, die parallel zur Faserachse verlaufen. Die Fibrillen bestehen auf molekularer Ebene je nach Zusammensetzung der zugrundeliegenden Aminosäuren aus kristallinen Bereichen, welche in eine amorphe Matrix eingebettet sind. Modifiziert nach ^[21] mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier.

Der Kernbereich der MA-Faser besteht aus entlang der Faserachse ausgerichteten Bündeln von teilweise miteinander verdrehten Mikro- und Nanofibrillen.^[53, 57-58] Mit Hilfe von Röntgenbeugungsanalysen wurden in diesen Fibrillen hochgeordnete, nanokristalline Bereiche aus β -Faltblattstrukturen mit einer Größe von ca. $2 \times 5 \times 7$ nm nachgewiesen, die in einer amorphen Matrix eingebettet sind.^[59-62] Die Fibrillen bestehen aus mindestens zwei Hauptproteinklassen, die als *Major Ampullate* Spidroin 1 und 2 (MaSp1, MaSp2) bezeichnet werden und ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 200-350 kDa aufweisen.^[16, 63-65] Das hydrophobe MaSp1 besitzt einen niedrigen Prolingehalt, während das hydrophilere MaSp2 reich an Prolin ist.^[66-67] Das Verhältnis dieser beiden Proteine in der Faser unterscheidet sich spezieübergreifend je nach Spinnenart sehr stark, was einen deutlichen Einfluss auf die resultierende Mechanik hat.^[25, 68] Zudem ist das Proteinverhältnis von Umweltbedingungen und Ernährungszustand der Spinne abhängig.^[34, 69] Auch innerhalb der Kernregion kann es Unterschiede geben: So sind im Zentrum des Kernbereichs der *Dragline*-Fasern der goldenen Seidenspinne (*Nephila clavipes*) MaSp1 und MaSp2 nachgewiesen worden, während im äußeren Kernbereich nur MaSp1 vorherrscht.^[54] Im Falle

der europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* sind die zugrundeliegenden Proteine *A. diadematus* Fibroin 3 und 4 (ADF3, ADF4) bekannt und aufgrund ihres hohen Prolingehaltes beide den MaSp2 Proteinen zugeordnet, zeigen aber Unterschiede in der Hydrophobizität.^[20, 70]

Alle MaSp Proteine bestehen aus einer repetitiven Kerndomäne welche von nichtrepetitiven, hochkonservierten amino- (NTD) und carboxyterminalen (CTD) Domänen flankiert wird. Während die Kerndomäne keine definierte Tertiärstruktur aufweist und intrinsisch ungefaltet vorliegt,^[71-73] bestehen die Termini aus mehreren α -Helices und sind für die Lagerung der Proteine in der Spinne in löslicher Form und auch für die Faserbildung von entscheidender Bedeutung.^[74-76]

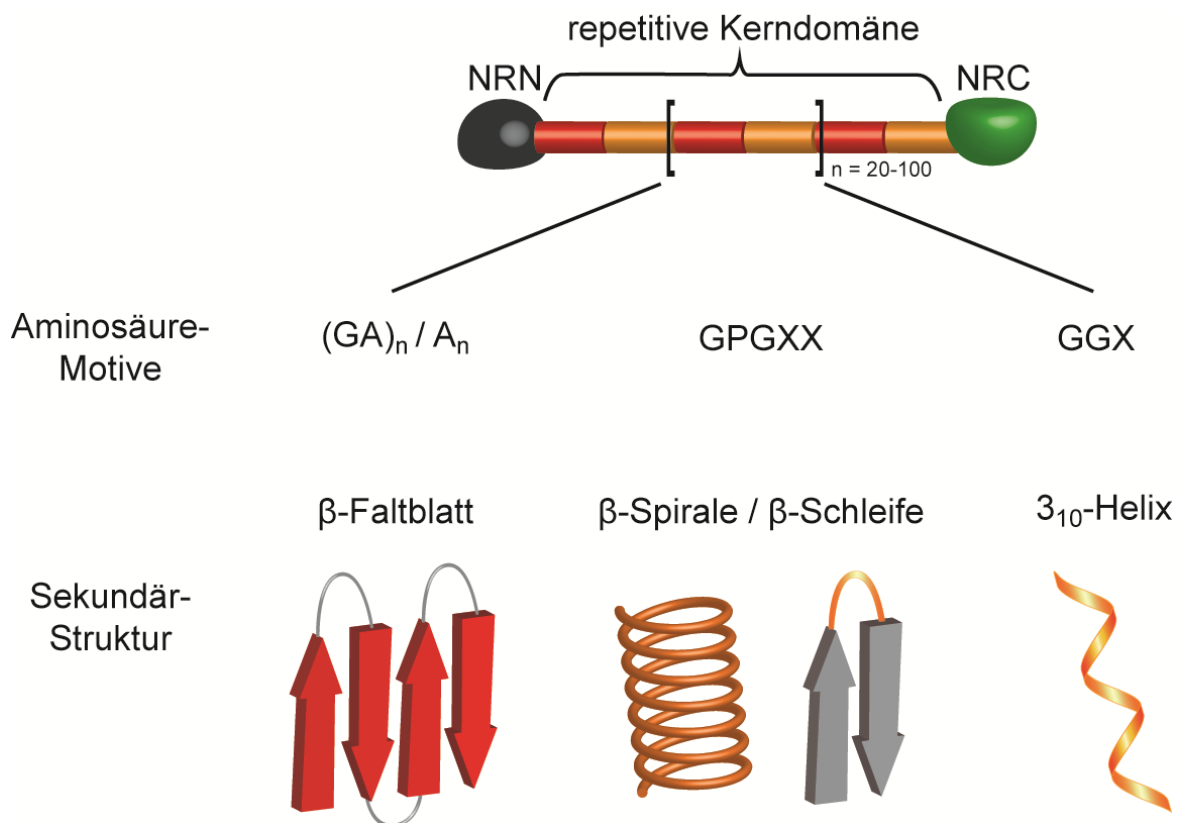


Abbildung 3: Schematischer Aufbau von MaSp Proteinen mit zugrundeliegenden Aminosäuremotiven und ausgebildeter Sekundärstruktur. NRN: nichtrepetitive aminoterminal Domäne, NRC: nichtrepetitive carboxyterminale Domäne. Modifiziert nach ^[77] mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

Die Kerndomäne macht in der Regel etwa 90 % der gesamten Proteinsequenz aus, ist für die makromolekularen Eigenschaften der Seide verantwortlich und besteht aus repetitiven,

konservierten Sequenzmotiven von 40-200 Aminosäuren Länge, welche sich bis zu 100-mal wiederholen.^[20, 39, 78] Jedes dieser Sequenzmotive beinhaltet Polyalanin- und Glycin-reiche Abschnitte (Abbildung 3).^[79]

Die Alanin-reichen Abschnitte (GA)_n und (A)_n (n=4-9) bilden in der Faser antiparallele β -Faltblattstrukturen aus und konnten den entdeckten kristallinen Regionen zugeordnet werden, welche als Quervernetzer agieren und mit einer Größenordnung von 11-35 % des Faservolumens einen maßgeblichen Beitrag zur hohen Zugfestigkeit von MA-Seidenfasern leisten.^[80-86] Die hydrophoben Alanin-Seitenketten interagieren miteinander und bilden so eine dicht gepackte und nur noch schwach wasserhaltige β -Faltblattstruktur.^[87]

Die Glycin-reichen Abschnitte, welche die amorphe Matrix ausbilden, bestehen aus (GGX)_n (X = Y, Q, L) und GPGXX (X = Y, Q, G) Motiven und sind für die hohe Elastizität und reversible Dehnbarkeit der Faser verantwortlich.^[87] Die GGX-Motive bilden dabei auf Sekundärstrukturebene 3_{10} -Helices aus, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander quervernetzt sind, wohingegen die GPGXX-Motive β -Schleifen und β -Spiralen bilden.^[63, 86, 88-90] Diese GGX-Helices dienen als Verbindung zwischen kristallinen β -Faltblattstrukturen und weniger starren Bereichen.^[87] Die Anzahl der Motivwiederholungen von GPGXX ist proportional zur Dehnbarkeit der entstehenden Seidenfaser.^[26, 63] Während GGX-Motive in beiden MaSp Klassen vorkommen, findet man die Prolin-haltigen GPGXX-Motive nur in MaSp2.^[87, 91]

1.2.2.2 TERMINALE DOMÄNEN

Die nichtrepetitiven N- (NRN) und C-terminalen (NRC) Domänen von Spinnenseidenproteinen spielen eine Schlüsselrolle bei der Lagerung der Proteine in einer hochkonzentrierten Spinnlösung und bei der Assemblierung der Proteine zu einer stabilen Faser.^[74, 76] Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass beide terminalen Domänen sowohl spezieübergreifend (MA Spidroine) als auch innerhalb der anderen Seidentypen einer Spinnenart hochkonserviert sind, wobei NRN die am stärksten konservierte Domäne darstellt (Abbildung 4).^[20, 39, 74-75, 92-102] Diese hohe Sequenz- und Strukturkonservierung war ein erstes Anzeichen für eine unabdingbare physiologische Funktion beider terminaler Domänen.^[74, 78, 93]

A

Abbildung 4: Sequenzvergleich von MaSp NRN (A) und NRC (B) Domänen verschiedener Spidroine. AtMaSp2: *Argiope trifasciata* MaSp2 (NRN Sequenz: DQ059136, NRC Sequenz: AF350266), CmMaSp1s: *Cyrtophora moluccensis* MaSp1s (AGQ04592), EaMaSp1: *Euprosthernops australis* MaSp1 (AM259067), LgMaSp1: *Latrodectus geometricus* MaSp1 (NRN sequence: DQ059133S1, NRC Sequenz: DQ059133S2), LhMaSp1: *Latrodectus hesperus* MaSp1 (EF595246), LhMaSp2: *Latrodectus hesperus* MaSp2 (EF595245), NiMaSp2: *Nepenthes inaurata madagascariensis* MaSp2 (NRN Sequenz: DQ059135, NRC Sequenz: AF350278). Die Symbole markieren zu 100 % konservierte Aminosäuren (*) und Konservierungsgrade (>70 %) zwischen Aminosäuren mit vergleichbaren (:) und weniger ähnlichen (.) Eigenschaften. Entnommen aus den „Supporting Information“ von ^[103] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Im Jahr 2005 wurde die erste NRN Sequenz eines *Major Ampullate* Seidenproteins beschrieben.^[92] Seitdem ist seine molekulare Struktur und die physiologische Funktion in der Spinnndrüse und bei der Faserassemblierung im Fokus unzähliger Untersuchungen. NRN ist zwischen 120 und 130 Aminosäuren lang^[95] und besteht aus einem homologen Bündel von fünf α -Helices (Abbildung 5A), was durch Kristallstruktur- und NMR-Analysen (engl.: *nuclear magnetic resonance*) gezeigt werden konnte.^[74-75, 104-105] Das NRN Monomer weist einen deutlichen makroskopischen Dipolcharakter auf, da die an der Oberfläche exponierten geladenen Aminosäuren in einem positiv (R57, K62) und einem hochkonservierten negativ geladenen Cluster (D39, E76, E81) am entgegengesetzten Ende arrangiert sind (Abbildung 5B).^[74-75, 97, 104] Bei neutralem pH-Wert und moderater NaCl Konzentration (Bedingungen bei der Lagerung der Spidroine in der Ampulla; vgl. 1.2.3) liegt NRN als stabiles Monomer vor, während sich bei pH-Erniedrigung und Abfall der NaCl Konzentration (Bedingungsänderungen im Verlauf des Spinnprozesses) ein antiparalleles NRN Dimer mit einem stark hydrophoben Dimerinterface ausbildet (Abbildung 5C und D).^[74-75, 106-107]

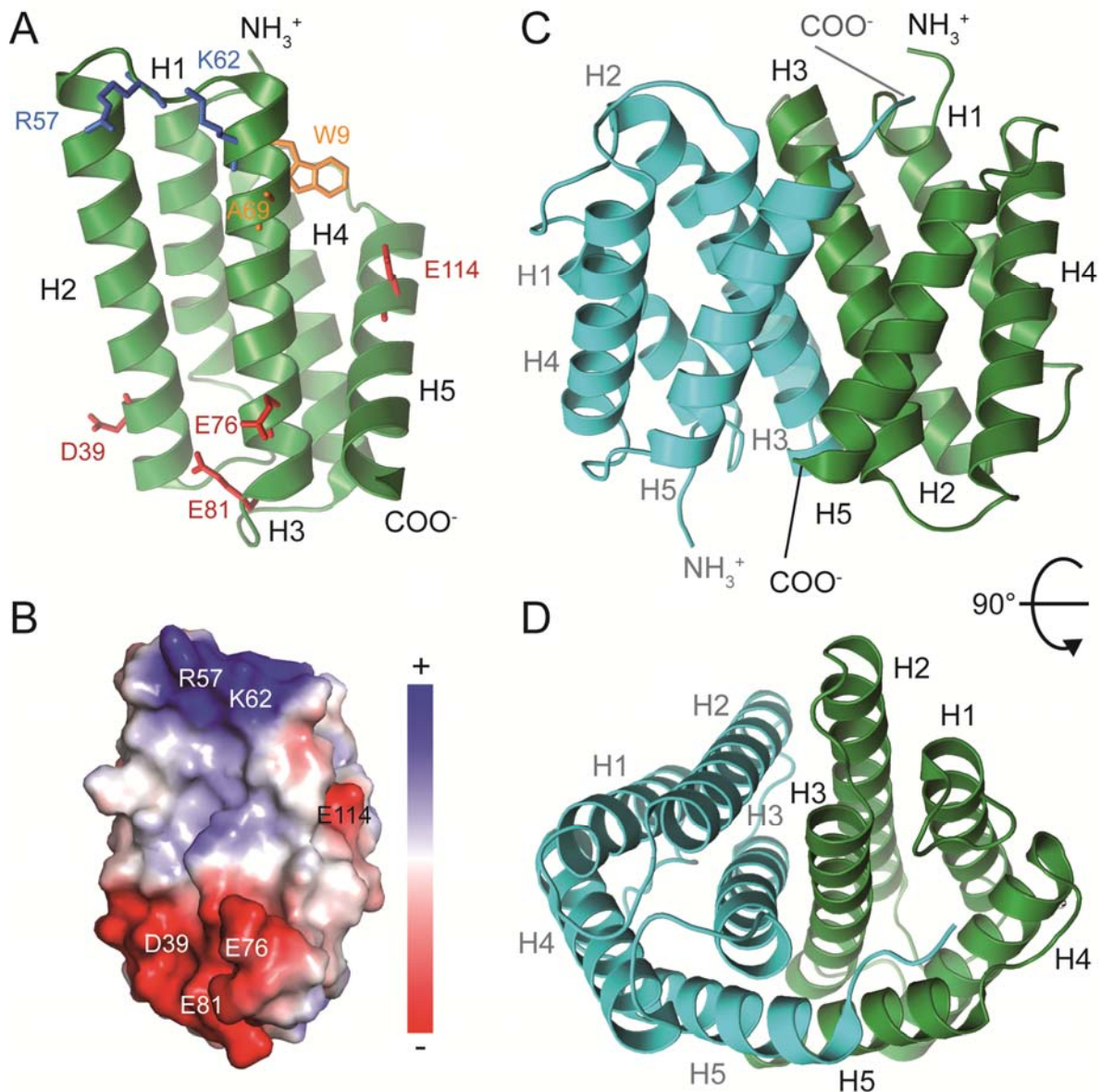


Abbildung 5: Struktur der aminoterminalen Domäne (NRN) von MaSp1 aus *Euprostheneopsis australis*. (A) Struktur des aus 5 Helices (H1-H5) bestehenden NRN Monomers (PDB: 3LR6).^[74] Die Seitenketten der an der Dimerisierung beteiligten Aminosäuren in den Helices 2, 3 und 5 sind farbig hervorgehoben. (B) Die Ladungsverteilung auf der Oberfläche zeigt deutlich den bipolaren Charakter von NRN, da die basischen und sauren Aminosäuren in entgegengesetzt liegenden Clustern organisiert sind (PDB: 2LPI).^[104] Das elektrostatische Oberflächenpotential ist von -5 (rot) bis +5 kT e⁻¹ (blau) angegeben. (C, D) Struktur des antiparallelen NRN Homodimers aus unterschiedlichen Blickwinkeln (PDB: 3LR6). Die Nummerierung der konservierten Aminosäuren wurde an die ursprüngliche Publikation zur Struktur von NRN aus *Latrodectus hesperus* angepasst.^[75] Die Abbildungen wurden mit PyMOL erstellt und das Oberflächenpotential mit APBS errechnet.^[108-109]

Die Ausbildung des stabilen NRN Dimers findet über verschiedene Zwischenstufen durch die schrittweisen Protonierung spezifischer und hochkonservierter Aminosäuren in den Helices 2, 3 und 5 statt.^[105, 110] Bei den physiologischen Bedingungen der Spidroinlagerung in der Ampulla (pH 7,2, hohe Ionenstärke) liegen die Aminosäuren D39, E76, E81 und E114 deprotoniert vor und stabilisieren die monomere Form.^[105] Die Absenkung des pH-Wertes (auf mindestens pH 5,7) und die Abnahme der Salzkonzentration im Verlauf des Spinnkanals fördern elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den sauren und basischen Polen benachbarter Monomere, was zur einer initialen Vorausrichtung zweier Monomere zu einem antiparallelen Dimer führt.^[105, 110-112] An dieser Bindung sind hauptsächlich Wechselwirkungen der Aminosäuren D39 und E81 mit basischen Aminosäuren beteiligt.^[107] Zusätzlich stabilisiert die Protonierung von E114 diese dimere Zwischenform.^[110, 113] Dabei wird das vorher im Inneren der Struktur liegende W9 zur Oberfläche hin exponiert.^[74-75, 104, 106] Nachfolgende gleichzeitige Protonierung der sauren Aminosäuren D39, E76 und E81 reduziert die Ladungsabstoßung zwischen den Helices 2 und 3 und führt so durch intramolekulare Konformationsänderung zur Ausbildung eines stabilen NRN Dimers. Das Dimer wird zusätzlich durch Salzbrücken stabilisiert, die sich zwischen D39 und E81 der ersten Untereinheit mit R57 und K62 der zweiten Untereinheit ausbilden, ebenso wie durch intermolekulare Interaktion die beiden Alanine (A69) einer jeden Untereinheit.^[104, 114-116]

Experimente mit rekombinanten Mini-Spidroinen (26,9 kDa, bestehend aus NRN und vier repetitiven MaSp Kerndomänen-Untereinheiten) zeigten, dass die Anwesenheit von NRN die Aggregation der Spidroine bei neutralem pH unterdrückt.^[74] Die antiparallele NRN Dimerisierung bei pH-Erniedrigung trägt zu einer strukturierten Ausrichtung und Assemblierung der Spidroine bei.^[74-75, 117]

Der hochkonservierte NRC ist kleiner als NRN (zwischen 87 und 100 Aminosäuren), besteht ebenfalls aus fünf homologen α -Helices und wird über zwei intramolekulare Salzbrücken zwischen den einzigen geladenen Aminosäuren R43-D93 und R52-E101 stabilisiert, die sich im am höchsten konservierten Teil von NRC befinden (Abbildung 6).^[76, 95] Das einzige in der Sequenz der meisten MaSp Proteine vorhandene Cystein (C92) verknüpft zwei NRC Domänen über eine Disulfidbrücke in der hydrophoben Helix 4 kovalent zu einem parallelen ausgerichteten Dimer.^[76, 94, 118] Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass sich ein stabiles Dimer auch ohne diese Disulfidbrücke hauptsächlich aufgrund des stark hydrophoben

Charakters der Helix 4 im Dimerisierungsinterface ausbildet.^[99] Die beiden Helices sind zueinander so angeordnet, dass die Helix 1 der ersten Domäne die Helix 5 der zweiten Domäne in einer klammerähnliche Weise fixiert, was die Stabilität des Dimers zusätzlich erhöht.^[76, 98]

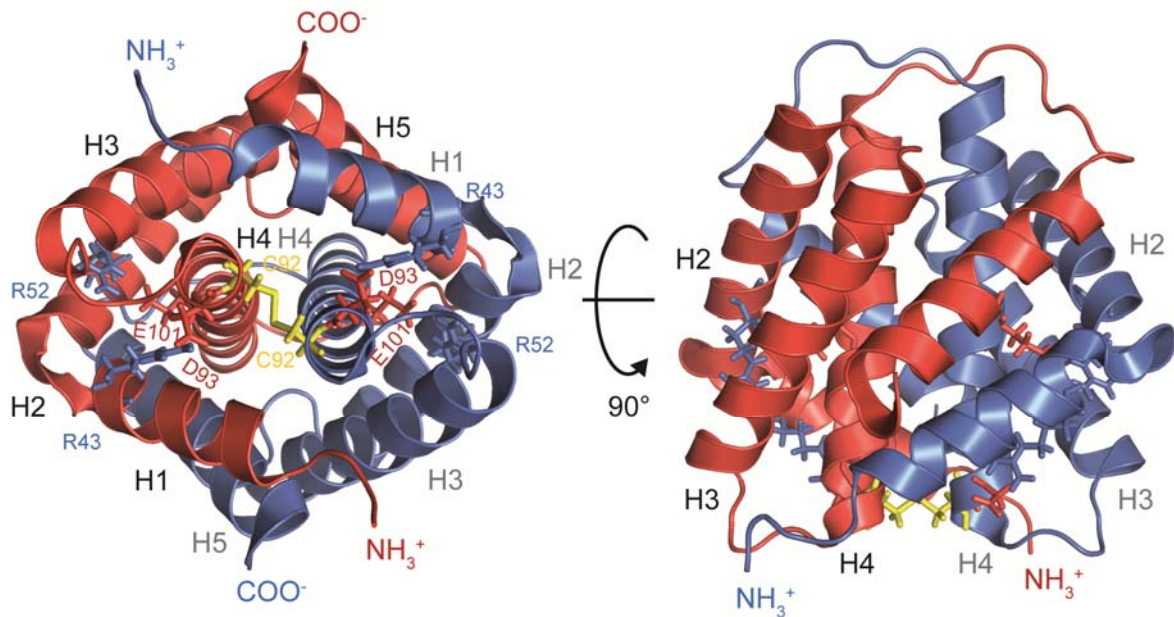


Abbildung 6: Struktur der carboxyterminalen Domäne (NRC) von MaSp2 (ADF3) aus *Araneus diadematus*. Die aus fünf Helices bestehende C-terminale Domäne wird durch intramolekulare Salzbrücken (grün) stabilisiert, und zwei Domänen werden durch eine Disulfidbrücke (gelb), ausgehend von den hochkonservierten Cysteinresten in Helix 4, kovalent zu einem parallelen Dimer verknüpft (PDB: 2KHM aus ^[76]). Die Abbildungen wurden mit PyMOL erstellt.^[108]

Obwohl die Aminosäuresequenz von NRC im Vergleich zur der repetitiven Kerndomäne der Spidroine einen relativ hydrophoben Charakter aufweist, sind die hydrophoben Reste im gefalteten Zustand im Inneren der Struktur verborgen, während an der Oberfläche polare, hydrophile Aminosäuren wie Glutamin und Serin für die Ausbildung einer Hydrathülle verantwortlich sind.^[76] Dies unterstützt zusammen mit dem hydrophilen NRN die Ausbildung nematischer Spidroin-Mizellen, an deren Oberfläche sich die beiden Termini anlagern und somit vor Aggregation schützen.^[119] Zusätzlich stabilisiert eine hohe NaCl Konzentration, wie sie während der Lagerung der Proteine in der Ampulla der Spinndrüse vorliegt, das NRC-Dimer gegen thermische und chemische Denaturierung und verhindert unspezifische Aggregation. Ein schrittweiser Austausch des NaCl gegen Kaliumphosphat

(wie im Spinnprozess) verstärkt das Aussalzen durch den kosmotroperen Charakter der Phosphationen um bis zu 100 %.^[76, 120] Im Verlauf des Spinntrakts wird NRC durch Scherkräfte und das Absinken des pH-Wertes destabilisiert und partiell entfaltet, wodurch die hydrophoben Aminosäurereste aus dem Inneren exponiert werden und die Oligomerisierung von NRC zu amyloiden β -Faltblattstrukturen durch hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt wird.^[76, 112, 121-123] Man konnte zeigen, dass NRC bei noch niedrigeren pH-Werten von unter 5,0 in eine sogenannte *molten globule*^[124-125] Struktur übergeht, die eine Art Zwischenzustand darstellt, und nach mehreren Stunden β -kristalline, faserartige Strukturen ausbildet.^[122, 126] Die Autoren postulieren daher, dass NRC der Ursprung für die Aggregation der Polyalanin-Bereiche in der Spidroin Kerndomäne ist.^[126] Da der dafür notwendige pH-Wert allerdings in der Spinnndrüse noch nicht nachgewiesen wurde und die zeitliche Abfolge viel zu langsam ist, ist der Einfluss dieses NRC Zwischenzustandes auf die Faserassemblierung *in vivo* fraglich.^[110, 122]

Rheologische Messungen an (Mini-)Spidroinen mit NRC zeigen zudem, dass die Anwesenheit von NRC unter Scherkrafteinfluss einen Viskositätsanstieg zur Folge hat, und somit den Übergang der Mizellen zu kristallinen β -Faltblatt Strukturen induziert, während Spidroine ohne NRC unspezifisch aggregieren.^[76, 100, 117, 127-130] NRC hat damit sowohl eine entscheidende Rolle bei der Lagerung der hochkonzentrierten Spidroine in der Ampulla als auch bei der Assemblierung der Spidroine zu einer festen Seidenfaser mit entlang der Faserachse ausgerichteten β -Faltblatt Strukturen.^[21, 67, 76, 117, 119, 131-132]

NRC ist an einem weiteren Prozess beteiligt, der für den Spinnprozess von entscheidender Bedeutung ist. Bei Dialyse von in Denaturierungsmitteln gelösten rekombinanten Spidroinen mit NRC gegen Phosphat, bilden sich zwei Phasen unterschiedlicher Viskosität und Proteinkonzentration aus.^[103, 120, 133] Das Phosphat bewirkt eine partielle Rückfaltung von NRC^[76], was die Spidroine zu Mizellen vorassembliert und die Trennung in zwei Phasen von unterschiedlicher Viskosität verursacht.^[133] Zwar ist die zugrundeliegende Sekundärstruktur der Spidroine in beiden Phasen identisch, dennoch lassen sich nur aus der hochviskosen Phase stabile, β -Faltblatt-reiche Fasern ziehen.

Neueste Studien zeigen, dass die korrekte Faltung von NRN und NRC durch die jeweils andere Domäne nicht beeinflusst wird. Ebenso konnte keine Interaktion der beiden terminalen Domänen nachgewiesen werden.^[134] Somit haben beide Termini ihre eigene,

unabhängige Funktion bei der Speicherung der Spidroine in der Ampulla und ihrer Assemblierung zu einer Endlosfaser mit mikrokristallinen β -Faltblattstrukturen.^[75]

1.2.3 NATÜRLICHER SPINNPROZESS

Der natürliche Spinnprozess ist ein hochkomplexer Vorgang in einer definierten biochemischen Umgebung, bei dem die Spinnenseidenproteine, welche in hochkonzentrierter Form in wässriger Lösung gespeichert sind, während der Passage des Spinnkanals unter Einfluss von Scherkräften, Wasserentzug, Ionenaustausch und Absenkung des pH-Wertes zu einer festen Seidenfaser assemblieren.^[19, 27] Die *Major Ampullate* Drüse von Webspinnen lässt sich schematisch in mehrere funktionelle Bereiche untergliedern (Abbildung 7).

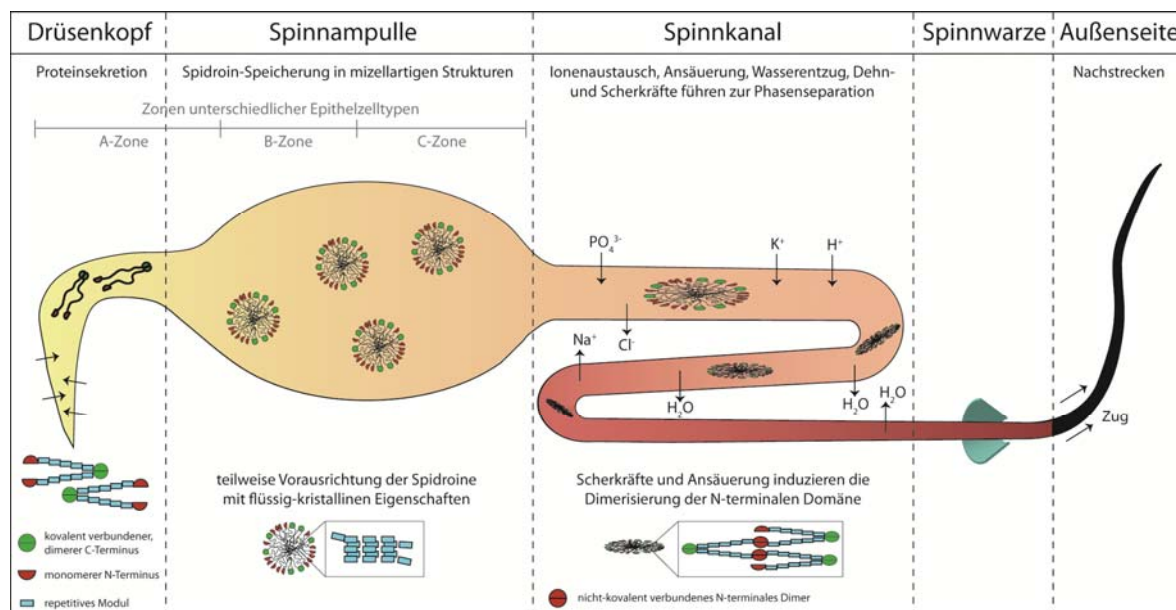


Abbildung 7: Schematische Darstellung des natürlichen Spinnprozesses am Beispiel der *Major Ampullate* Drüse. Modifiziert nach ^[98] mit freundlicher Genehmigung des Verlages John Wiley and Sons.

Drüsenfortsatz (Drüsenkopf) und Ampulla sind zusammen durchschnittlich 60 mm lang und machen mit 10 mg etwa 1 % des Gesamtgewichtes einer weiblichen Webspinne aus.^[19] Beide Abschnitte sind mit speziellen Epithelzellen ausgekleidet, von denen die Spinnenseidenproteine synthetisiert und ins Lumen der Spinnrüse sekretiert werden.^[121, 135-136] Man unterscheidet je nach Epithelzelltyp zwischen A-, B- und C-Zonen, deren scharfe

Abgrenzung mikroskopisch deutlich erkennbar ist. Die Zelltypen unterscheiden sich in Größe, Zellkernposition und unterschiedlich großer und verteilter Granula.^[137] Der Großteil der Spidroine wird in der A-Zone (Bereich des Drüsenfortsatzes) synthetisiert und sekretiert,^[138-140] während die Epithelzellen der B-Zone überwiegend andere Proteine wie z. B. Glykoproteine sekretieren, welche eine externe schnell polymerisierende Schicht um die Spidroinphase ausbilden.^[19, 54, 137, 141] Die Zellen der C-Zone sekretieren keine Spidroine, sondern produzieren membrangebundene Bestandteile der Zellmikrovilli.^[137]

Die Spidroine werden in der Ampulla in Anwesenheit von chaotropen Natrium- und Chloridionen als hochviskose wässrige Spinnlösung bei sehr hohen Konzentrationen von bis zu 50 % (w/v) gespeichert.^[19, 114, 142-143] Bereits während dieser Speicherung findet eine erste Vorausrichtung der Spidroine in mizellartige Assemblate mit flüssigkristallinem, nematischem Charakter statt.^[127, 136, 144-146] Zudem wirken die hydrophilen Eigenschaften der terminalen Domänen der Spidroine einer unkontrollierten Aggregation entgegen, indem sie die äußere Kontaktfläche der Mizellen bilden und so die hydrophoben Bereiche der Proteine im Inneren der Mizellen von den wässrigen Umgebungsbedingungen abschirmen.^[74, 76, 120, 147]

Die entscheidenden Prozesse der Faserassemblierung finden während der Passage der Spinnlösung durch den S-förmigen Spinnkanal statt. Die Innenseite des Spinnkanals ist mit einer speziellen Kutikulaschicht ausgekleidet, welche die Struktur einer hohlfaserartigen Dialysemembran aufweist.^[148-149] Zum einen werden dort die chaotropen Natrium- und Chloridionen durch kosmotropere Kalium- und Phosphationen ausgetauscht und der Spinnlösung aktiv Wasser entzogen, was das Aussalzen der Spidroine begünstigt.^[150-151] Zum anderen bewirken eine Carboanhydrase und epitheliale Ionenkanäle die Absenkung des pH-Wertes im Verlauf des Spinnkanals von 7,2 auf mindestens 5,7.^[110, 122, 150, 152] Diese pH-Wert Erniedrigung hat entscheidende strukturellen Änderungen innerhalb der terminalen Domänen der Spidroine zur Folge und verdeutlicht ihre Schlüsselrolle bei der Faserassemblierung (vgl. 1.2.2.2). Die daraus resultierende antiparallele Dimerisierung von NRN und die permanente parallele Dimerisierung von NRC führen zu einer dauerhaften Quervernetzung der Spidroine.^[74-76, 153] Zusätzlich treten durch die sich nach distal verjüngende Form des Spinnkanals Scher- und Elongationskräfte auf, welche die Ausbildung und Ausrichtung von β -Faltblattstrukturen in der zuvor größtenteils ungeordneten Polyalanin-Region initiieren.^[19, 121, 136, 144, 154-157] Das Zusammenspiel all dieser Parameteränderungen führt zu stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen, begünstigt

die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und destabilisiert die lösliche Spidroinform, was zur Assemblierung beiträgt.^[30] Die Ausbildung dieser festkristallinen Phase läuft langsamer ab als die Bildung der flüssigkristallinen Phase in der Ampulla.^[158] Im Spinnkanal findet kein aktiver Transport der Spidroine statt. Vielmehr werden die Scherkräfte und der Laminarfluss im letzten Teil des Spinnkanals dadurch erzeugt, dass die Spinne den fertig assemblierten Faden entweder aktiv mit ihren Hinterbeinen oder durch Einsatz der Schwerkraft vom Hinterleib abzieht.^[159] Die Abzugsgeschwindigkeit nimmt Einfluss auf die Größe und Orientierung der resultierenden β -Faltblattkristalle und somit auf die mechanischen Eigenschaften der Seidenfaser.^[57]

Das ventilähnliche Organ (Spinwarze), welches die Seidenfaser gegen Ende der Spinndrüse durchläuft, ist für die Möglichkeit der unmittelbaren Fortsetzung des Spinnprozesses im Falle eines auftretenden Faserabrisses verantwortlich.^[19]

1.2.4 MOLEKULARE STRUKTUR & MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN

Um die mechanischen Eigenschaften von Spinnenseide erklären zu können ist es wichtig, die zugrundeliegenden nanoskopischen Strukturen und deren Funktion sowohl experimentell als auch mittels Computersimulationen zu betrachten.

Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf den β -Faltblattkristallstrukturen, die von Polyalanin-Bereichen gebildet werden und in einer amorphen Matrix bestehend aus 3_{10} -Helices, β -Schleifen und β -Spiralen eingebettet sind (vgl. 1.2.2.1).^[64, 160-162] Untersuchungen der Polyalanin-Bereiche zeigten, dass die native Anzahl von mindestens sechs Alaninen in MaSp Seide die kritische Grenze und acht Aminosäuren das Optimum für das Ausbilden von hochstabilen β -Faltblattkristallen darstellt.^[163] Bei unter sechs Alaninresten bilden sich keine oder nur teilweise β -Faltblätter aus, wohingegen eine deutliche höhere Anzahl an Alaninen zwar die Qualität der Nanokristallgeometrie nicht weiter verbessert aber die mechanischen Eigenschaften der Kristalle leicht erhöht, wobei bei einer Anzahl von 12 Alaninen ein Maximum erreicht wird.^[164-166]

Die β -Faltblattkristalle sind wenige Nanometer groß und bestehen aus dicht gepackten antiparallelen β -Faltblattsträngen, die mittels Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind und zur hohen Zugfestigkeit der Seidenfaser beitragen.^[23, 63] Unter Zugspannung treten in den Nanokristallen vor allem laterale Kräfte auf.^[87, 167] Dabei wirken

die β -Kristalle als ineinandergreifende Bereiche, wodurch die Belastung auf die einzelnen β -Stränge abgeleitet werden kann, was dazu führt, dass die Kristallstruktur erst bei hohen Kräften nachgibt.^[168-170] Simulationen zeigten, dass die beteiligten und für sich allein genommen relativ schwachen Wasserstoffbrückenbindungen dabei zusammenspielen und in einem kleinen Bereich von wenigen Bindungen gleichzeitig deformiert werden, was die auftretenden Kräfte verteilt und somit zur Zugfestigkeit der Faser beiträgt.^[171-172] Zusätzlich können sich Wasserstoffbrücken nach einem initialen mechanischen Versagen an anderer Stelle neu ausbilden. Um diese Erkenntnisse zu vertiefen, wurden Krümmungs- und Zugexperimente mit Nanokristallen unterschiedlicher Größe (2-7 nm) simuliert (Abbildung 8).^[168]

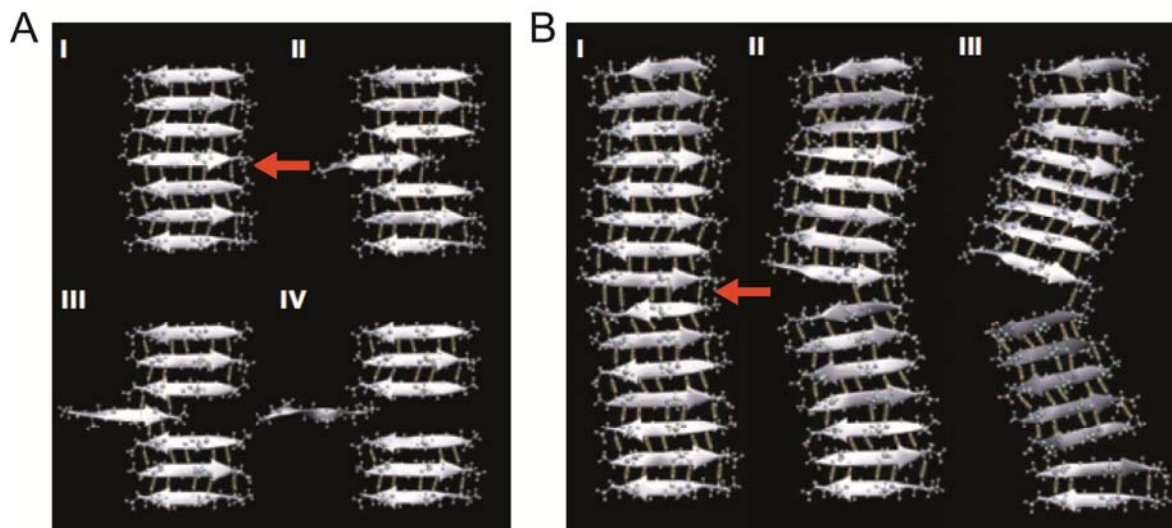


Abbildung 8: Verformung von β -Nanokristallen unterschiedlicher Größe. Während kleine Kristalle (A) steifer sind und bei Scherung eines Strangs nachgeben, sind große Kristalle (B) anfälliger für Krümmung. Der rote Pfeil markiert den Ort der simulierten lateralen Krafteinwirkung auf die Nanokristallstrukturen. Modifiziert nach ^[168] mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Für die Simulation der Krümmungsexperimente wurde eine konstante laterale Kraft an einem Ende der Nanokristalle angelegt und das zweite Ende fixiert. Bei den Zugexperimenten wurde ein β -Faltblattstrang aus der Mitte der Struktur gezogen (seitliche Verschiebung), während die anderen Stränge fixiert blieben. Dieses Setup wurde gewählt, da kleinere Nanokristalle hauptsächlich durch Scherung und große Nanokristalle vor allem durch Krümmung versagen.^[173] Bei lateralem Krafteinfluss liegt der Übergang von seitlicher

Verschiebung einzelner β -Stränge zur Krümmung der gesamten Struktur bei einer Nanokristallgröße von etwa 2,5 nm.

Kleine Nanokristalle sind steifer, was unter lateraler Belastung zu einer Art Haftgleiteffekt durch Reißen und Neubildung der Wasserstoffbrückenbindungen führt, als Resultat mehr Energie abbaut und für höhere Zugfestigkeit sorgt. Das Maximum an Steifigkeit, Zugfestigkeit und Zähigkeit erhält man bei einer Nanokristallgröße von etwa 3 nm.^[50, 168] Auch die Gesamtbelastbarkeit, bis die Struktur initial nachgibt, steigt mit kleiner werdender Kristallgröße, was die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt.^[174-175] Größere Nanokristalle sind spröder und geben bei geringerer Belastung nach, da ihre Wasserstoffbrückenbindungen im Gegensatz zu kleinen Nanokristallen bei Krümmung auf einer Seite unter punktueller Spannung stehen, was deren Zusammenspiel verhindert und die entsprechenden Fasern instabiler macht.^[57]

Auch die amorphen Bereiche beeinflussen die mechanischen Eigenschaften der Fasern. Ein gewisser Anteil der amorphen Matrix steht unter einer Vorspannung und verbindet die Nanokristalle untereinander über wurmartige Ketten (engl.: worm-like chains, WLCs).^[176-179] Zusätzlich können lateral auftretende Kräfte aus den Nanokristallen in die WLCs abgeleitet werden, was die signifikante Dehnbarkeit der amorphen Bereiche ermöglicht.^[180-181] Die Vorspannung sorgt für ein Ungleichgewicht und wird in der trockenen Faser vom Fasermantel und den rund um den Faserkern liegenden Strukturen (Wasserstoffbrückenbindungen) ausgeglichen.^[54, 64] Wird die Faser nass, schwächt dies die Stabilität dieser Strukturen und führt zum Effekt der Superkontraktion, welcher die Fasern bei hoher Luftfeuchtigkeit bis zu 50 % schrumpfen lässt.^[49, 182-183] Wasser wirkt demnach als natürlicher Weichmacher auf die Fasern.^[184-185]

Daraus lässt sich in Übereinstimmung von simulatorischen und experimentellen Daten ein vierphasiges Model für das nichtlineare Verhalten von Spinnenseide und deren einzelnen Bereiche bei lateraler Krafteinwirkung (Zug) auf die Faser entwickeln.^[160-161, 173] In der ersten Phase wird die amorphe Matrix gleichmäßig bis zu ihrer Bruchgrenze gestreckt (linear elastische Verformung). Ab dieser Grenze beginnen die Wasserstoffbrücken in den 3_{10} -Helices, β -Schleifen und β -Spiralen aufzubrechen.^[50, 160, 186] In der zweiten Phase kann sich die amorphe Matrix aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrücken zu ihrer vollen Länge entlang der Faserachse entfalten (Fließzone/Softening). Gleichzeitig kommt es zur partiellen Neubildung von Wasserstoffbrücken, was zu kleinen β -Kristallen in der amorphen Region

führt.^[161] Erst in der dritten Phase, wenn die amorphe Matrix maximal entfaltet und gestreckt ist, wird die Kraft auf die β -Nanokristalle übertragen (Verfestigung).^[50] Dort lösen sich aus den Nanokristallen als Folge des Haftgleiteffektes zunächst einzelne β -Stränge oder es entstehen kleinere Kristalle, die zur kurzzeitigen Verfestigung der Faser beitragen, wenn ihre Zugfestigkeit höher ist als die des ursprünglichen Kristalls.^[161] Anschließend entfalten sich in der vierten Phase die β -Faltblattstrukturen komplett, bis die Faser schließlich nachgibt.^[187] Eine zweite Fließzone kurz vor Reißen der Faser wurde lediglich in der Simulation beobachtet,^[50, 188] experimentell aber nicht bestätigt.^[189-190]

Dieser spezielle Mechanismus, der auf der Kombination von amorpher Matrix und β -Nanokristallbereichen beruht, ist die Grundlage für die Dehnbarkeit, Zugfestigkeit und herausragende Zähigkeit von Spinnenseide.

1.2.5 MASPIs

Anfang 2013 wurde von einer südkoreanischen Arbeitsgruppe ein neuartiges *Dragline* Spinnenseidenprotein in *Cyrtophora moluccensis* (Abbildung 9A) beschrieben.^[191]

Die Gattung *Cyrtophora* gehört taxonomisch zur Familie der echten Radnetzspinnen (Araneidae), obwohl viele ihrer Vertreter kein echtes Radnetz, sondern vielmehr ein horizontales, zeltartiges Netz bauen (Abbildung 9B), welches von manchen Arachnologen entweder als Vorläufer oder, was wahrscheinlicher ist, als Abwandlung des bekannten Radnetzes angesehen wird.^[192-193] Die Netze sind äußerst widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse wie Regen, Wind und Temperaturschwankungen, zeigen keine Superkontraktion und überdauern teilweise länger als einen Monat ohne, wie bei anderen Spinnenarten üblich, kontinuierlich recycelt und erneuert zu werden.^[194] Die Art *Cyrtophora moluccensis* wurde erstmals 1857 von dem österreichischen Insektenforscher Ludwig Doleschall beschrieben.^[195] Die adulten Weibchen werden im Durchschnitt 24 mm groß, während die Männchen mit knapp 8 mm deutlich kleiner sind.^[193] Der natürliche Lebensraum dieser Spinnenart erstreckt sich auf überwiegend offene Habitate küstennaher, bergiger oder wäldlicher Landstriche von Indien über Indonesien, Japan, Papua-Neuguinea, Australien und Fidschi bis Tonga.^[8, 192, 196-197] *Cyrtophora moluccensis* ist eine der wenigen Spinnenarten weltweit, deren Individuen untereinander ein gewisses soziales Verhalten zeigen und in großen Kolonien von mehr als 400 Tieren auf bis zu 15 m² Fläche zusammenleben.^[196, 198] Die Vor- oder Nachteile für das einzelne Individuum an einer

solchen Form des Zusammenlebens sind nicht abschließend zu bewerten. Zwar sind derartige Kolonien effizienter was Netzbau, Beutefang und den Schutz der Eikokons und Nachkommen angeht, andererseits werden große Kolonien von potentiellen Beutetieren schneller erkannt und gemieden. Zudem begünstigt die räumlich dichte Form des Zusammenlebens die Ausbreitung von Parasiten und macht die Kolonie zu einem leichten Ziel für Fressfeinde.^[198-203]

Ursprung der neu entdeckten Nucleotid- bzw. Gensequenz war eine angelegte cDNA Datenbank. Diese wurde mit Hilfe reverser Transkription aller isolierter RNA- und mRNA-Fragmente aus den Spinndrüsen der in Papua-Neuguinea gesammelten Spinnen erstellt.^[204] Zusätzlich wurden die *Dragline*-Seidenfasern der gesammelten Spinnen in Harnstoff denaturiert und gelelektrophoretisch bezüglich seiner Proteinbestandteile analysiert. Dabei wurde neben den bekannten großen *Major Ampullate* Spidroinen (MaSp1, MaSp2) ein zusätzliches schwaches Signal für ein ungewöhnlich kleines Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa identifiziert. Insgesamt wurden 1344 Klone mit Fragmenten aus der cDNA Datenbank sequenziert und die Resultate mit allen publizierten Spinnenseidengensequenzen aus den Datenbanken DDBJ (DNA Data Bank of Japan) und NCBI (National Center for Biotechnology Information) abgeglichen. Dabei konnte eine Sequenz mit 1233 Basenpaaren (bp) bestimmt werden, die mit der erwarteten Größe des kleinen Proteins auf dem SDS-Gel korrespondiert. Da die Gensequenz am 5'-Ende unvollständig war, wurde sie mittels inverser PCR (iPCR) ergänzt, besteht final aus 1320 bp, die für 439 Aminosäuren codieren, und wurde aufgrund seiner untypischen Größe „MaSp1 short“ (MaSp1s) genannt. MaSp1s lässt sich wie alle bekannten MA Spidroine in eine N-terminale, eine C-terminale und eine Kerndomäne unterteilen (Abbildung 9C).

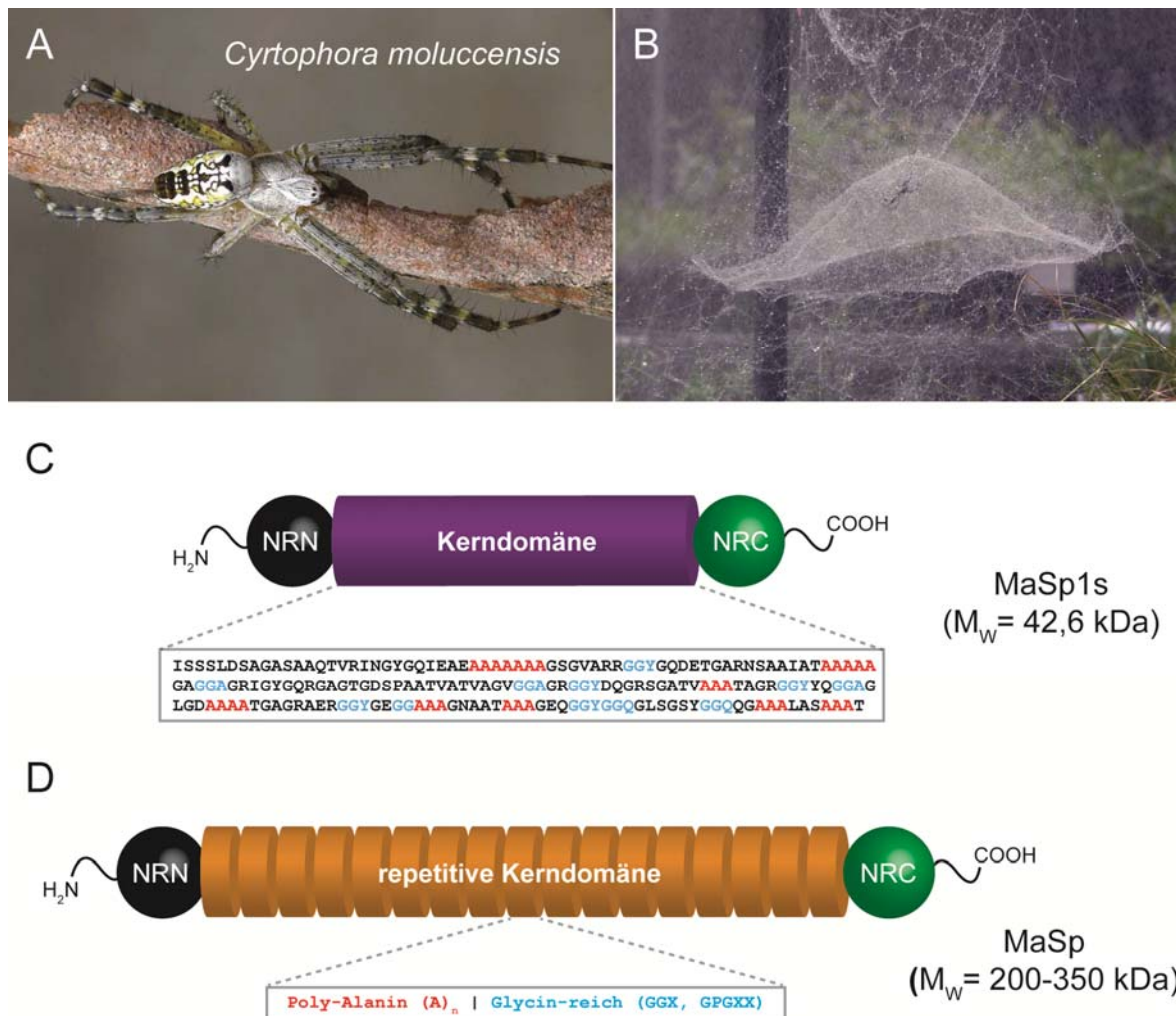


Abbildung 9: (A) Weibliche Spinne der Spezies *Cyrtophora moluccensis* und (B) deren zeltartige Netzkonstruktionen. (C) Schematischer Aufbau von MaSp1s aus *Cyrtophora moluccensis* im Vergleich (D) mit bislang bekannten MaSp Proteinen. NRN: Aminoterminal Domäne, NRC: Carboxyterminale Domäne, M_w : Errechnetes Molekulargewicht. Bildnachweis (A, B): Mit freundlicher schriftlicher Abdruckgenehmigung des Fotografen und Copyrightinhabers Robert Whyte, Brisbane, Australien (http://www.arachne.org.au/01_cms/details.asp?ID=946).

Während die terminalen Domänen hochkonserviert sind (vgl. Abbildung 4), weicht die MaSp1s Kerndomäne deutlich von bekannten Mustern ab: So ist sie im Vergleich zu den Kerndomänen aller anderen bekannten MaSp Proteine (Abbildung 9D) deutlich kleiner und hat keinen repetitiven Aufbau aus sich gleichmäßig wiederholenden Untereinheiten. Die Zuordnung zur Klasse der MaSp1 Proteine beruht auf dem Vorkommen der charakteristischen MaSp1 Motive Polyalanin, GGX (X = A, Q, Y) und GX (X = Q, A, R) sowie der Abwesenheit von MaSp2 typischen GPG-Motiven. Die enthaltenen Polyalanin-Bereiche sind allerdings mit 3-7 Aminosäuren deutlich kürzer als von bekannten MaSp Proteinen bekannt und zudem in der Sequenz unregelmäßig verteilt.

Die beschriebene Charakteristik des MaSp1s Proteins in Verbindung mit dem quantitativ schwachen Signal bei der Analyse der *Dragline*-Seide im SDS-Gel, legen die Vermutung nahe, dass MaSp1s keinen entscheidenden Beitrag zur mechanischen Stabilität der Spinnenseidenfasern leistet. Aufgrund der Homologie der terminalen Domänen zu anderen MaSp Proteinen, spekulierte die Arbeitsgruppe um Han et. al. auf eine mögliche Funktion von MaSp1s bei der Speicherung oder Assemblierung der Seidenproteine.^[191] Diese eben genannte Veröffentlichung aus dem Jahre 2013 legte den Grundstein für die rekombinante Herstellung, Charakterisierung und vielfältige Verarbeitung von MaSp1s im Rahmen dieser Dissertation.

1.3 REKOMBINANTE SPINNENSEIDE

Spinnen zeigen territoriales und kannibalisches Verhalten und können daher im Unterschied zu *Bombyx mori* nicht in großer Anzahl zur Seidengewinnung gemeinsam gehalten werden.^[205] Zwar kann die *Dragline*-Seide manuell aus der Spinne gewonnen werden,^[206] was allerdings zeitaufwendig ist und zu geringen Ausbeuten führt.^[207] Zudem nehmen die Qualität und die damit verbundenen mechanischen Eigenschaften der Seide in Gefangenschaft deutlich ab, was wahrscheinlich vom Klima und dem vorherrschenden Ernährungszustand der Spinne abhängt.^[28, 121, 208] Da die medizinische und industrielle Nachfrage nach Spinnenseide aufgrund ihrer herausragenden mechanischen und biochemischen Eigenschaften immer weiter steigt, wurden biotechnologische Prozesse etabliert, um die Herstellung von Spinnenseidenproteinen in großem Maßstab und mit gleichbleibender Qualität ermöglichen zu können.

1.3.1 HERSTELLUNGSSTRATEGIE

Viele prokaryotische und eukaryotische Wirtsorganismen wie Pflanzen (Kartoffel, Tabak, *Arabidopsis thaliana*, Soja),^[209-212] Insektenzellen (*Bombyx mori*, *Spodoptera frugiper*a),^[70, 213-215] tierische Zellen (Babyhamsternieren (BHK)-Zellen; Rinder-Mammaepithelalveolar (MAC)-Zellen, Meerkatzennieren (COS-1)-Zellen),^[216-217] Hefe (*Pichia pastoris*),^[218-219] transgene Tiere (Ziege, Maus)^[220-222] und Bakterien (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*)^[67, 223-227] wurden für die rekombinante Herstellung von Spinnenseidenproteinen verwendet.

Der ursprüngliche Ansatz, natürliche Gensequenzen (cDNA) der Spinnenseide in anderen Organismen zu exprimieren, stellte sich als kostenintensiv und wenig effizient heraus. Es gab Probleme durch die unterschiedliche Codonverwendung von Spinnen und Wirtsorganismen, was zu ineffektiver Translation, Reinigungsproblemen und einer niedrigen Ausbeute von wenigen Milligramm pro Liter Kulturmedium führte.^[216, 228-229] Zusätzlich wird die Herstellung durch den hochrepetitiven Charakter der Seidengene erschwert.^[31, 66, 225]

Daher werden in einem vom Lehrstuhl Biomaterialien etablierten Ansatz auf Grundlage der natürlichen, hochkonservierten und repetitiven Gensequenzen Konsensussequenzen identifiziert. Sie werden bezüglich ihrer Größe und Codonverwendung an den entsprechenden Wirtsorganismus angepasst und enthalten alle wichtigen Sequenzmotive der zugrundeliegenden natürlichen Gene.^[229] Die Sequenzen der bekannten terminalen Domänen können ebenfalls hinzugefügt werden um Proteine mit dem Aufbau des natürlichen Vorbilds zu erhalten.^[31, 74, 76, 78, 132-133] Mithilfe eines revolutionären „nahtlosen“ Klonierungssystems können derartige Module beliebig multimerisiert und kombiniert werden.^[67] Der dabei gewählte Ansatz zur rekombinanten Produktion von Spinnenseidenproteinen ist die Herstellung in dem gram-negativen Enterobakterium *Escherichia coli* (Abbildung 10). Dieses liefert ein sehr gut kontrollierbares und kosteneffizientes System, welches gleichbleibende Proteinqualität garantiert, einfache Eingriffe in den Metabolismus des Organismus ermöglicht und die Herstellung im großen Maßstab erlaubt.^[228, 230] Die gewünschte angepasste Gensequenz wird in einen Expressionsvektor kloniert, in *E. coli* transformiert und mittels Hochzelldichtefermentation kultiviert und exprimiert.^[228] Manche Proteine werden als Fusionskonstrukte mit einem aminoterminalen Sumo-Tag hergestellt, was die Löslichkeit erhöht, das Protein stabilisiert und dessen Nachweisbarkeit verbessert.^[231-232] Das gewünschte Seidenprotein muss anschließend gereinigt, das heißt vor allem von den wirtseigenen Proteinen und einem eventuellen Reinigungstag separiert werden. Hierzu haben sich je nach Protein vor allem Fällungsreaktionen (Hitze, Salz) und säulenchromatographische Trennungsmethoden (Affinitäts-, Ionenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie) bewährt.^[67] Der Großteil der so hergestellten Proteine ist zwischen 10 und 160 kDa groß.^[21, 79, 233] Für größere Proteine ist ein weitaus aufwändigerer Eingriff in den *E. coli*-Metabolismus nötig und an entsprechender Stelle in der Literatur beschrieben (z. B. artifizielle Zugabe von

tRNAs, selektive Überexpression tRNA codierender Gene, alternative Splicing-Strategie).^[224, 234]

Bei der Gartenkreuzspinne *A. diadematus* wurden aus den repetitiven Blöcken in ADF3 die Module A (Alanin-reich) und Q (Glutamin-reich) abgeleitet, während aus ADF4 das Modul C generiert wurde.^[67] Allerdings ist darüber hinaus nur die Sequenz der nichtrepetitiven C-terminalen Domäne beider ADF-Proteine, nicht aber die der N-Termini bekannt. Um bei Bedarf strukturell vollständige Proteine zu erhalten, wird dafür auf die etablierten und gut charakterisieren terminalen Domänen der schwarzen Witwe *Latrodectus hesperus* (NRN1 (N1), NRC1 (C1)) zurückgegriffen (Abbildung 10).^[75, 105]

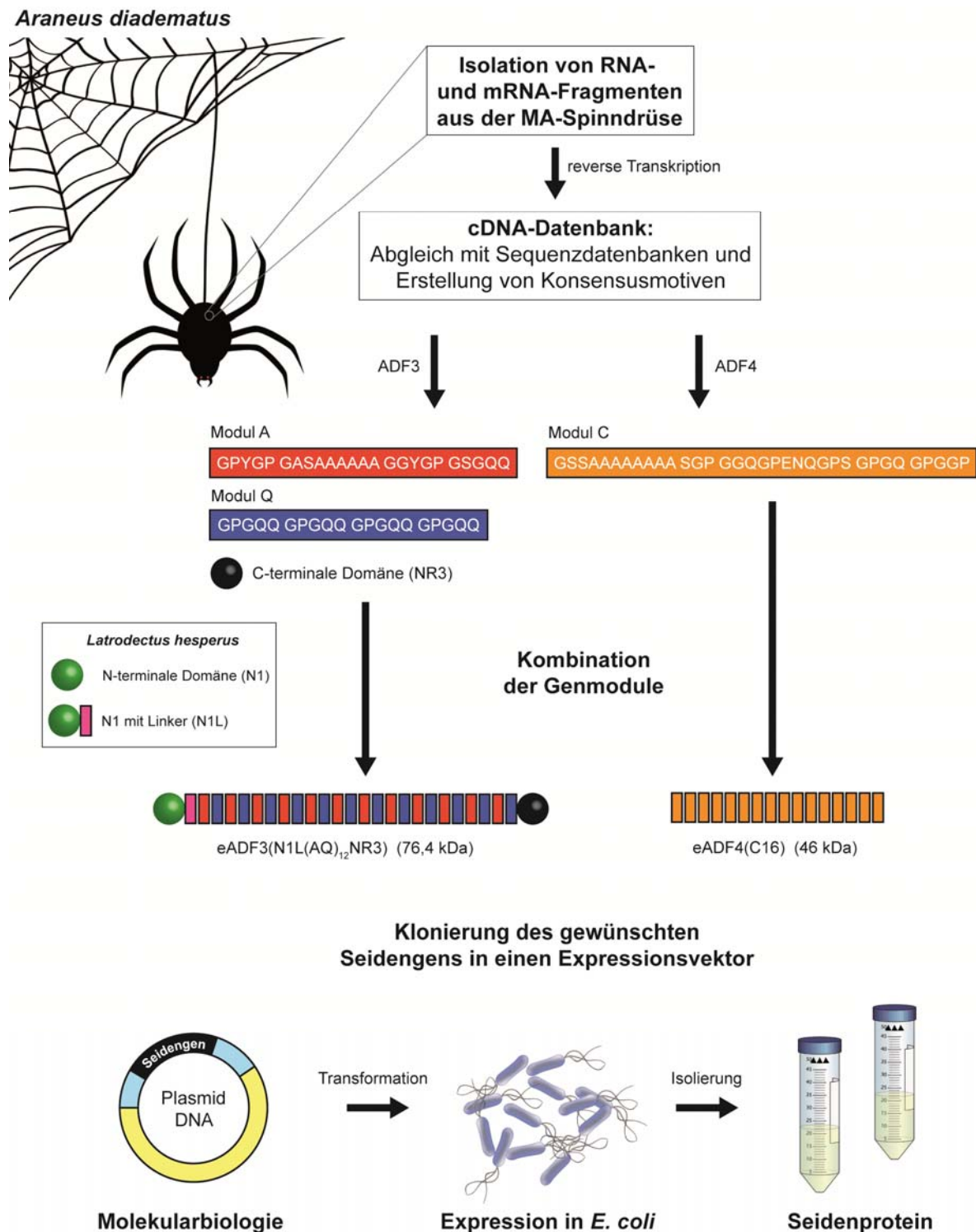


Abbildung 10: Schematische Darstellung der rekombinanten Herstellung von beliebigen Spinnenseidenproteinen in *Escherichia coli* am Beispiel von *Araneus diadematus* (vgl. Abbildung 11). Auf Grundlage von identifizierten cDNA-Sequenzen können Seidengenmodule identifiziert, neu kombiniert, in einen Wirtsorganismus transformiert und exprimiert werden. Aus Gründen der Anschaulichkeit ist anstatt der zugrundeliegenden Nukleotidsequenz die Aminosäuresequenz der Module gezeigt. Nach abschließender Reinigung und Gefriertrocknung liegt das reine Seidenprotein in Pulverform vor.

1.3.2 VERARBEITUNG

Rekombinant hergestellte Spinnenseidenproteine können zu einer Vielzahl an Morphologien wie Fasern (mittels Nassspinnen,^[133, 216, 219, 224, 235-236] elektrostatisches Spinnen (Vliesstoffe),^[237-240] Mikrofluidik^[128]), Hydrogele,^[241-243] Filme,^[244-248] Schäume,^[249-251] Kapseln^[252-253] oder Partikel^[254-256] verarbeitet werden. Besonderer Fokus liegt in dieser Arbeit auf der Verarbeitung zu nassgesponnenen Fasern und Hydrogelen. Alle anderen Morphologien sind an entsprechender Stelle in der Fachliteratur ausführlich beschrieben.

1.3.2.1 FASERHERSTELLUNG DURCH NASSSPINNEN

Beim Nassspinnen wird eine Polymer- oder Proteinlösung durch eine Spinnndüse in ein Fällbad extrudiert, was zur Präzipitation des Polymers und damit zur Ausbildung einer festen Faser führt.^[31, 257-258] Dazu ist im Falle der rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteine zunächst eine hochkonzentrierte Spinnlösung nötig.^[259-260] Die Proteine werden dazu entweder in organischen Lösungsmitteln (HFIP, Ameisensäure) oder wässrigen Puffern aufgenommen.

Mithilfe von organischen Lösungsmitteln können auf einfache Weise Proteinlösungen mit einer Konzentration von 10-30 % (w/v) hergestellt werden.^[224, 236, 261-263] Allerdings haben organische Lösungsmittel einige entscheidende Nachteile: Sie denaturieren die Seidenproteine, was zwar zu deren hoher Löslichkeit aber auch zu Problemen bei der Faserassemblierung führen kann. Des Weiteren ist es schwierig, die Lösungsmittel aus den resultierenden Fasern wieder rückstandslos zu entfernen, was deren Einsatz für biomedizinische Anwendungen erschwert.^[264] Zudem ist eine Verwendung von organischen Lösungsmitteln für industrielle Anwendungen aufgrund der hohen Kosten und der strikten Entsorgungsrichtlinien nur eingeschränkt möglich.

Daher ist es erstrebenswert, eine Spinnlösung auf wässriger Basis zu etablieren, die kein Risiko für den Einsatz in der Biomedizin darstellt und die Assemblierung der Seidenproteine nicht behindert. Hochkonzentrierte Spinnlösungen auf wässriger Basis mit einer maximalen Proteinkonzentration von 30 % (w/v)^[219] lassen sich herstellen, indem man die Proteine entweder direkt in hoher Konzentration in einem wässrigen Puffer löst,^[219, 265-266] sie aus einer niedrigkonzentrierten wässrigen Lösung konzentriert^[133, 260] oder durch die Selbstassemblierung der Proteine in wässrigen Puffern gewinnt.^[120, 130, 132-133, 236] Da das

direkte Lösen von rekombinanten Seidenproteinen in hoher Konzentration in wässrigen Systemen sehr energie- und zeitaufwändig ist,^[265-266] wurden von Heidebrecht et. al.^[133] für rekombinante Spinnenseidenproteine zwei Wege zur Herstellung wässriger Spinnlösungen etabliert: Zunächst wurden die Proteine in Guanidiniumthiocyanat gelöst, das anschließend durch Dialyse gegen einen stabilisierenden salzhaltigen Tris-Puffer schrittweise entfernt wurde und zu Proteinkonzentrationen von 2-3 % (w/v) führte. Eine anschließende Dialyse gegen einen Phosphatpuffer bewirkte bei Proteinen mit C-terminaler Domäne eine Phasenseparation (vgl. 1.2.2.2) in eine Phase mit sehr geringer und eine Phase mit hoher Proteinkonzentration (9-15 % (w/v)), die versponnen werden konnte (BSD, *biomimetic spinning dope*).^[120, 133, 153] Proteine, die keine Phasenseparation aufwiesen, konnten durch Wasserentzug via Dialyse gegen Polyethylenglykol (PEG) zu einer klassischen Spinnlösung (10-17 % (w/v)) konzentriert werden (CSD, *classical spinning dope*). Die BSD-Lösungen konnten 3-5 Tage stabil gelagert werden, während CSD-Lösungen schon nach wenigen Stunden anfällig für Aggregation waren.^[133, 241, 267]

Kontinuierliche Extrusion dieser Spinnlösungen in ein Fällbad aus entweder reinen einwertigen Alkoholen (Ethanol, Methanol, Isopropanol) oder Alkohol-Wasser-Mischungen führt zur Entwässerung der Spidroine, wodurch sich eine stabile Spidroinfaser im Größenbereich von wenigen Mikrometern bildet. Durch Änderungen an der Zusammensetzung des Fällbads kann man die mechanischen Eigenschaften der resultierenden Fasern beeinflussen.^[268] Das Nassspinnen ist im Vergleich zum elektrostatischen Spinnen ein eher langsamer Vorgang. Dadurch erreichen die Spidroine während des Spinnprozesses jedoch ein höheres Maß an molekularer Ausrichtung, was zu Fasern mit verbesserten mechanischen Eigenschaften führt.^[77]

Durch anschließendes Strecken (Nachbehandlung) der Fasern an Luft oder in einem Nachstreckbad wird deren Mechanik deutlich verbessert.^[268] Das Nachstreckbad muss im Gegensatz zum Fällbad einen gewissen Anteil an Wasser enthalten, welches in der Faser als Weichmacher dient und eine gewisse Flexibilität in der Ausrichtung der zugrundeliegenden Proteine ermöglicht.^[263-264] Es konnte gezeigt werden, dass das Nachstrecken den β -Faltblattanteil der Faser deutlich erhöht und die β -Faltblattkristalle entlang der Faserachse ausrichtet.^[133, 235] Während Nachstrecken in einem Bad mit primären Alkoholen zu Fasern mit höherer Steifigkeit und Festigkeit führt, erhöht Nachstrecken der Fasern in einem Bad mit sekundären Alkoholen deren Dehnbarkeit.^[268]

Aufgrund der Vielzahl an Variationsmöglichkeiten und Parametern muss die ideale Kombination aus Spinnlösung, Fällbad und Nachbehandlung für jedes Protein und die final gewünschten Fasereigenschaften einzeln optimiert und etabliert werden. Eine große Anzahl unterschiedlichster, rekombinant hergestellter Spinnenseidenproteine wurde bereits mittels Nassspinnen zu Fasern verarbeitet, wobei deren mechanische Eigenschaften den natürlichen Fasern lange Zeit stets unterlegen waren.^[77, 154, 233] Grundsätzlich gilt, dass sich die mechanischen Eigenschaften der Fasern mit kleiner werdendem Durchmesser^[269] und steigendem Molekulargewicht^[224] der zugrundeliegenden Proteine verbessern. Erst 2015 gelang es erstmals, aus einem rekombinant hergestellten Spinnenseidenprotein mit N- und C-terminaler Domäne (N1L(AQ)₁₂NR3, 76 kDa) mittels Nassspinnen biomimetische Fasern herzustellen, deren Mechanik mit natürlichen Seidenfasern vergleichbar ist. Zwar waren die biomimetischen Fasern dehnbarer (110 %) als natürliche MA-Fasern (24 %), die aber wiederum zugfester (1183 MPa) als die biomimetischen (370 MPa) waren, was zu einer Zähigkeit vergleichbarer Größenordnung führte (189 MJm⁻³ vs. 167 MJm⁻³).^[133]

1.3.2.2 HYDROGELE

Der Begriff „Hydrogel“ wurde 1896 erstmalig in der Fachliteratur erwähnt^[270] und beschreibt quervernetzte, hydrophile, fibrilläre Polymernetzwerke, die in der Lage sind bis zu 99 % (w/w) ihres Trockengewichtes an Wasser einzulagern und dadurch physikalisch zu quellen ohne sich aufzulösen.^[242, 271-274] Hydrogele können aus einer Vielzahl an natürlichen (Seide, Alginat, Kollagen, Agarose, Chitosan) und synthetischen (PLA (Polylactid), PEG (Polyethylenglycol)) Polymeren hergestellt und aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur, ihrer Biokompatibilität und ihrer rheologischen Charakteristik und hydrophilen Eigenschaften für biomedizinische Anwendungen verwendet werden.^[275-279] Seit der Produktion der ersten synthetischen Hydrogele im Jahre 1960^[280] werden Hydrogele in vielen Bereichen wie Hygieneprodukten,^[281] Wirkstofftransport,^[281-282] Nahrungsmittelzusätzen,^[283] Arzneimitteln,^[284-285] Gewebezüchtung,^[272, 277, 280, 286-289] Wundauflagen,^[290-292] Biosensoren^[293-295] oder Biomedizin^[296-297] eingesetzt.

Hydrogele entstehen durch physikalische oder chemische Vernetzung von Polymeren. Auf chemischem Wege lassen sich Hydrogele durch Bestrahlung oder mittels chemischer Quervernetzer kovalent verknüpfen, während physikalische Hydrogele (Alginat, Agarose, Gelatine) dynamisch und reversibel durch nicht-kovalente Wechselwirkungen (ionisch,

elektrostatisch, hydrophob) oder Wasserstoffbrücken quervernetzt sind.^[242, 298] Bei den selbstassemblierenden Strukturen lagern sich Einzelbausteine spontan oder durch Parameter wie spezifische Erkennungssequenzen, Temperatur, Konzentration oder pH-Wert zu größeren supramolekularen Einheiten zusammen, die durch nicht-kovalente Interaktionen zusammengehalten werden.^[241, 299-300] Beispiele für solche Strukturen sind das Kollagen der menschlichen Haut oder Keratin in Haaren und Nägeln.^[301-303]

Aufgrund der Bioverträglichkeit, Bioabbaubarkeit und geringen Immunogenität ist Spinnenseide ein vielversprechendes Material für den medizinischen Einsatz in Hydrogelen.^[279] Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) (16 Wiederholungseinheiten einer Konsensussequenz aus *Araneus diadematus* fibroin 4. Die terminalen Domänen sind für die Hydrogelbildung nicht essentiell; zudem ist der N-Terminus von ADF4 nicht bekannt.) assembliert unter definierten Bedingungen zu stabilen Hydrogelen, die aus Proteinfibrillen bestehen.^[241-242, 304-305] Die Selbstassemblierung der Fibrillen wird durch den amphiphilen Charakter von eADF4(C16) unterstützt und beginnt mit einer Nukleationsphase, in der intrinsisch unstrukturierte Proteine oligomerisieren und antiparallele β -Faltblattstrukturen ausbilden.^[267, 306-307] Diese werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, über hydrophobe Interaktionen der exponierten Alaninreste miteinander vernetzt und bilden so einen Nukleationskeim an den sich weitere Monomere oder Oligomere anlagern, welche durch Konformationsänderung zum Fibrillenwachstum führen (Elongationsphase).^[267, 308-310] Die Analyse dieser Nanofibrillen mittels Infrarotspektroskopie (FTIR) und Röntgenbeugung (X-Ray) zeigte Amyloid-ähnliche *Cross*- β -Strukturen, die entlang der Fibrillenachse ausgerichtet sind.^[304-305, 311] Durch physikalische Quervernetzung dieser Proteinfibrillen kommt es schließlich zur Hydrogelbildung.^[241-242, 250, 312]

Hydrogele aus rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteinen zeigen moderates Scherverdünnungsverhalten mit hoher Viskosität bei niedriger Scherrate und einer Abnahme der Viskosität bei höheren Scherraten.^[313] Das elastische Verhalten ist dabei dominanter als das viskose Verhalten des Hydrogels, was zu niedrig-viskosem Fließverhalten und gleichzeitig guter Formstabilität führt.^[241, 243] Aufgrund dieser Eigenschaften können die Hydrogele als vielversprechendes Material in der Biofabrikation verwendet und mittels Dispensdrucken verarbeitet werden.^[243, 314-316] Dabei wird das Hydrogel in eine Spritze gefüllt und entweder pneumatisch oder mechanisch durch eine feine Nadel als kontinuierliches Filament in die gewünschte Morphologie gedruckt, wobei die maximale

Auflösung ca. 200 μm beträgt.^[314-315] Die Hydrogele sind durch das Drucken keinerlei strukturellen Änderungen unterworfen und erlangen in kürzester Zeit ihre ursprüngliche Festigkeit, wodurch es möglich ist, viele Lagen übereinander zu drucken.^[243] Solche dreidimensionalen Hydrogelkonstrukte können aufgrund ihres hydrophilen und mechanisch stabilen Charakters in den medizinischen Bereichen Gewebezüchtung, Nervenregeneration und Wundheilung als Trägermatrix für Zellen verwendet werden.^[314] Erste *in vitro* (Mausfibroblasten) und *in vivo* Studien (menschliche primäre Fibroblasten) mit Gerüsten aus rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteinen zeigten, dass diese die Adhäsion, das Wachstum und die Kollagen Typ I Produktion der Fibroblasten unterstützten.^[317-320]

1.4 ZIELSETZUNG

Da das Molekulargewicht bisher untersuchter, natürlicher *Dragline*-Spinnenseidenproteine zwischen 200 und 350 kDa betrug,^[78, 321] war die Entdeckung eines nur ca. 40 kDa großen MaSp1 Volllängen-Proteins (MaSp1s) in *Cyrtophora moluccensis* durch eine koreanische Arbeitsgruppe im Jahr 2013^[191] umso erstaunlicher. MaSp1s unterscheidet sich von allen bis zu diesem Zeitpunkt bekannten MaSp Proteinen nicht nur durch die Abweichung im Molekulargewicht, sondern auch durch das Fehlen des repetitiven Charakters in der Kerndomäne. Über die Funktion und die Eigenschaften dieses Proteins war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt.

In dieser Arbeit sollte auf Basis der identifizierten Gensequenz das Spidroin MaSp1s rekombinant in *E. coli* hergestellt, anschließend gereinigt und charakterisiert werden, um einen ersten Eindruck von den Eigenschaften und der Struktur des Proteins zu erhalten. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der terminalen Domänen verschiedener Spidroine, auch zu denen von *C. moluccensis* (Abbildung 4), sollte die Kerndomäne von MaSp1 dazu mit den gut charakterisierten Termini von *Latrodectus hesperus* fusioniert und exprimiert werden.^[78, 98] Anschließend sollte eine Reinigungsstrategie etabliert und das isolierte Protein auf seine Sekundärstruktur und die thermische und chemische Stabilität hin untersucht werden.

Im zweiten Schritt sollte MaSp1 zu unterschiedlichen Morphologien wie Fasern oder Hydrogelen verarbeitet und deren Eigenschaften charakterisiert werden. In der Vergangenheit konnten in der Arbeitsgruppe von Prof. Scheibel bereits erfolgreich Fasern

aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein NIL(AQ)₁₂NR3^[133] und stabile Hydrogele aus eADF4(C16)^[241, 322] etabliert werden.

Das Potential von MaSp1s zur Herstellung stabiler klassischer und biometrischer Spinnlösungen und der Faserherstellung mittels Nassspinnen sollte zunächst mit reinem MaSp1s und anschließend in Kombination mit dem gut charakterisierten Volllängen-Seidenprotein (NIL(AQ)₁₂NR3)^[133] analysiert und die resultierenden Fasern hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturanteile und mechanischen Eigenschaften untersucht werden. MaSp1s sollte weiterhin nach dem etablierten Verfahren^[241] zu Hydrogelen verarbeitet, analysiert und rheologisch auf seine mechanischen Eigenschaften und das Fließverhalten untersucht werden. Der Einfluss der Zumischung eines weiteren Seidenproteins (eADF4(C16)) auf die Hydrogelbildung und Mechanik sollte nachfolgend ebenso analysiert werden wie die weitere Verarbeitung der Hydrogele mittels 3D-Druck-Verfahren und das Potential zur mechanischen Regeneration nach Scherbelastung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten Einblicke in die molekularen Eigenschaften und potentiellen Funktionen des neuartigen Spinnenseidenproteins MaSp1s bieten, sowie erste Möglichkeiten zur Verarbeitung und Anwendung des Proteins in unterschiedlichen Morphologien aufzeigen.

2. SYNOPSIS

Die vorliegende Dissertation umfasst vier Publikationen, die sich thematisch alle mit natürlichen und rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteinen in Verbindung mit deren spezifischen Funktionen und Anwendungen beschäftigen und in Kapitel 6 in vollem Umfang dargestellt sind.

Ein umfassender Überblick zum aktuellen Stand der Forschung zu Beginn dieser Dissertation in Bezug auf die rekombinante Herstellung, Verarbeitung und Modifikation von verschiedenen Spinnenseidenproteinen ist in Teilarbeit III dargestellt. So bieten die Tabellen 10.1 bis 10.3 der genannten Teilarbeit eine allgemeine Übersicht zu bisher verwendeten Wirtsorganismen, bislang hergestellten rekombinanten Proteinen und nassgesponnenen Fasern. Teilarbeit IV liefert einen tieferen Einblick zu einer essentiellen und hochkonservierten Struktur der Seidenproteine, indem sie sich mit einem Vergleich und der Funktionsbeschreibung der terminalen Domänen auseinandersetzt. Auch Teilarbeit V beschäftigt sich mit der Funktion und den Eigenschaften einer der beiden terminalen Domänen, entstand aber schon während der Masterarbeit und ist daher kein expliziter Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

Die Teilarbeiten I und II bilden den thematischen und experimentellen Schwerpunkt der Dissertation und befassen sich, ausgehend von den bekannten Methoden und Forschungsergebnissen, mit der rekombinanten Herstellung und Charakterisierung eines neuartigen Spinnenseidenproteins MaSp1s, welches zwar beide hochkonservierten terminalen Domänen besitzt, in seiner Primärstruktur und der repetitiven Kerndomäne jedoch deutlich von allen bislang bekannten MaSp Proteinen abweicht (Teilarbeit I, Abbildung 1). Anschließend wurde untersucht, ob eMaSp1s (engineered MaSp1s) alleine oder in Anwesenheit bereits etablierter rekombinanter Spinnenseidenproteine geeignet ist, um zu unterschiedlichen Morphologien wie Fasern (Teilarbeit I) oder Hydrogelen (Teilarbeit II) verarbeitet zu werden. Die entstehenden Produkte wurden abschließend strukturell und mechanisch charakterisiert, um potentielle Anwendungsbereiche zu erschließen.

Um die Resultate der eMaSp1s-Experimente gegenüberstellend einordnen und bewerten zu können, wurden bereits veröffentlichte Daten von Versuchen mit den bekannten rekombinanten MaSp Seidenproteinen aus *Araneus diadematus* herangezogen. Als Vergleichsprotein für die Faserbildung (Teilarbeit I) diente das etablierte

Volllängenkonstrukt eADF3(N1L(AQ)₁₂NR3),^[133] während eADF4(C16) als Referenz für die Herstellung und Verarbeitung von Hydrogelen (Teilarbeit II) verwendet wurde.^[241-242] Der jeweilige molekulare Ursprung der einzelnen Spinnenseidendomänen und die finale Zusammensetzung der verwendeten rekombinanten Proteine ist in Abbildung 11 schematisch gezeigt.

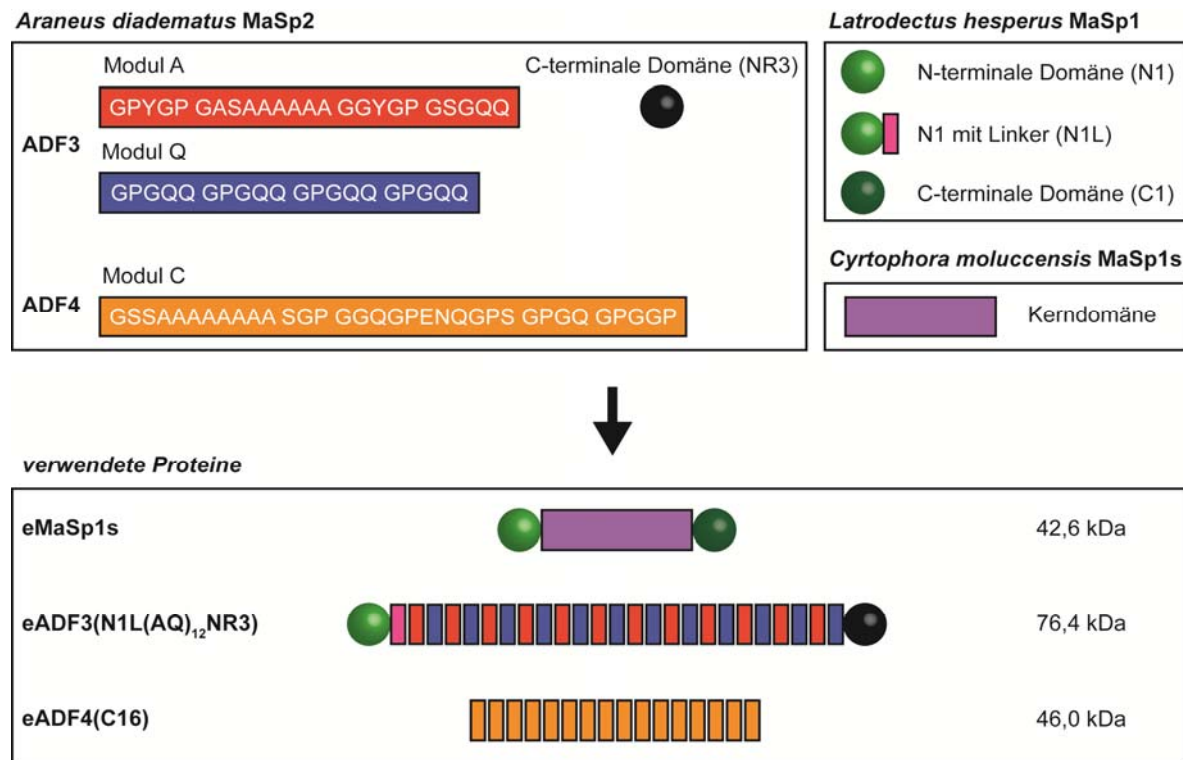


Abbildung 11: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine. Die Sequenzmotive der Module A, Q und C sind von den beiden MaSp2 Analoga ADF3 und ADF4 aus *Araneus diadematus* abgeleitet. Die hochkonservierten amino- und carboxyterminalen Domänen stammen aus *Araneus diadematus* (NR3) und *Latrodectus hesperus* (N1, N1L, C1). Die Kerndomäne von MaSp1s aus *Cyrtophora moluccensis* wurde nach der publizierten Sequenz aus ^[191] erstellt. Durch ein spezielles Klonierungssystem^[67] konnten die Domänen beliebig nahtlos kombiniert oder multimerisiert werden. Das theoretische Molekulargewicht wurde mit Hilfe des Onlinetools Protparam bestimmt (<http://web.expasy.org/protparam>).

Die folgenden Kapitel erläutern die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen zur Herstellung, Charakterisierung und Verarbeitung des neuartigen Spinnenseidenproteins eMaSp1s zu unterschiedlichen Morphologien. Außerdem werden Unterschiede und Gemeinsamkeiten mit bekannten und etablierten Spinnenseidenproteinen erläutert und

diskutiert. Detaillierte experimentelle Informationen sind den jeweiligen Publikationen zu entnehmen.

2.1. HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON eMaSp1s

Nach Entdeckung und Veröffentlichung der Sequenz von MaSp1s aus *Cyrtophora moluccensis* im Jahr 2013^[191] wurde deutlich, dass sich das Protein in seinem molekularen Aufbau von allen bis dato bekannten MaSp Proteinen (Teilarbeit III, Abbildung 10.1; Teilarbeit IV, Abbildung 1) signifikant unterscheidet. Das MaSp1s Protein besteht aus lediglich 439 Aminosäuren und besitzt eine nicht-repetitive Kerndomäne, die von den spinnenseidentypischen terminalen Domänen (Teilarbeit IV) flankiert wird (Abbildung 9C). Zudem beinhaltet die Kerndomäne von MaSp1s 22 geladene Aminosäuren. Die Zuordnung zur Klasse der MaSp1 Proteine beruht auf dem Vorhandensein von charakteristischen Poly-Alanin und GGX-Motiven und dem Fehlen der Aminosäure Prolin, wenngleich die Poly-Alanin Bereiche deutlich kürzer und inhomogener verteilt sind als in MaSp Proteinen üblich.^[87, 191] Die terminalen Domänen von MaSp1s sind hingegen in Übereinstimmung mit einer Vielzahl anderer MaSp Proteine hochkonserviert (Teilarbeit I, Abbildung S2; Teilarbeit IV, Abbildung 2). Aufgrund dieser Sequenzhomologie und um die Eigenschaften der MaSp1s Kerndomäne im Vergleich mit bekannten Spinnenseidenproteinen analysieren zu können, wurde diese mit den gut untersuchten und etablierten terminalen Domänen der schwarzen Witwe *Latrodectus hesperus* (nichtrepetitive N-terminale Domäne: NRN, nichtrepetitive C-terminale Domäne: NRC) fusioniert (Teilarbeit I).^[75, 78, 105]

Die Fermentation und Genexpression (als Fusionskonstrukt mit einem aminoterminalen poly-Histidin-Tag) erfolgte in *Escherichia coli*, gefolgt von einem entwickelten mehrstufigen Reinigungsprozess aus Affinitätschromatographie, Tag-Abspaltung, Ammoniumsulfat-Fällung und Gefriertrocknung. Die Proteinausbeute von eMaSp1s (engineered MaSp1s) war mit 300-400 mg pro Liter Kulturmedium deutlich höher als bei vielen andern MaSp Konstrukten (4-150 mg).^[21] Aufgrund der hohen Anzahl an geladenen Aminosäuren konnte eMaSp1s für nachfolgende Analysen bis zu einer Konzentration von etwa 2 % (w/v) direkt in wässrigen Puffern aufgenommen werden, in welchen es aufgrund der über eine Disulfidbrücke realisierten kovalenten Verknüpfung zweier C-terminaler Domänen stets als parallel orientiertes Dimer vorlag.

Die CD-spektroskopische Untersuchung der Sekundärstruktur von eMaSp1 in Lösung lieferte ein charakteristisches α -helikales Spektrum (Abbildung 12A), welches auf die Anwesenheit der α -helikal gefalteten terminalen Domänen zurückzuführen ist, während die Kerndomänen von MaSp Proteinen in Lösung weitestgehend unstrukturiert vorliegen.^[72] Die Sekundärstruktur bildet sich nach Entfaltung bei 90°C nach Abkühlung nahezu vollständig zurück. Die Beobachtung der temperaturinduzierten Strukturentfaltung ließ einen zweistufigen Prozess mit Übergängen bei 47 und 72°C erkennen, welche zweifelsfrei den Entfaltungstemperaturen der terminalen Domänen zugeordnet werden konnten (Abbildung 12B).^[75-76] Durch Zugabe des Reduktionsmittels TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) konnte die Disulfidbrücke und somit die Stabilität der C-terminalen Domäne geschwächt werden, was während der Rückfaltung zu erhöhter Proteinaggregation führte.

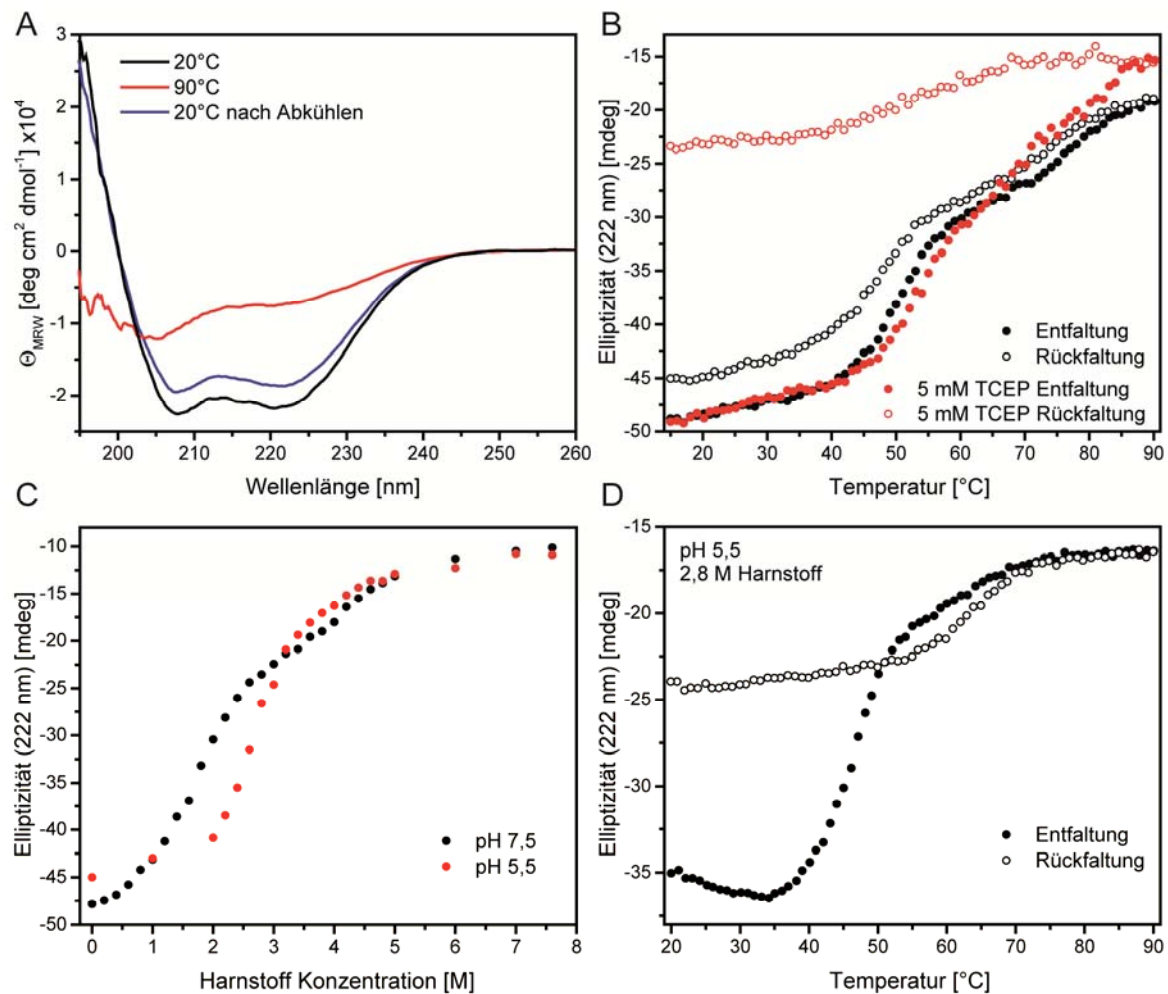


Abbildung 12: Untersuchung der Sekundärstruktur sowie der chemischen und thermischen Stabilität von eMaSp1s. (A) Fern-UV CD-Spektroskopie, (B) thermische Stabilität und Einfluss von TCEP, (C) chemische Stabilität unter Harnstoffeinfluss und (D) thermische Stabilität bei pH 5,5 in Anwesenheit von 2,8 M Harnstoff. Modifiziert nach ^[103] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Auch die Ergebnisse zur chemischen Stabilität mittels Harnstoffzugabe zeigten einen zweistufigen Übergang, basierend auf der schrittweisen Entfaltung der terminalen Domänen. Bei pH 7,5 (Bedingung während der Speicherung in der Ampulla) entfaltet NRN bei einer Harnstoffkonzentration von 1,9 M, während NRC bei etwa 3,6 M Harnstoff entfaltet. Bei pH 5,5 (Bedingung während der Passage des Spinnkanals) zeigt sich eine erhöhte strukturelle Stabilität von eMaSp1s (Abbildung 12C). Dies wurde in mehreren Studien bereits beschrieben und ist auf die stabile antiparallele Dimerisierung von NRN bei pH-Absenkung unter 6,0 zurückzuführen.^[75, 105, 107] Bei einer Harnstoffkonzentration von 2,8 M liegt der NRN entfaltet und NRC noch gefaltet vor. Testet man die thermische Stabilität von eMaSp1s bei dieser Konzentration und pH 5,5 zeigt sich beim Rückfalten wiederum eine

erhöhte Tendenz zur Aggregation, basierend auf der Destabilisierung der intermolekularen Salzbrücken von NRC bei diesem pH-Wert (Abbildung 12D).^[76] Die Sekundärstruktur von gelöstem eMaSp1s wird somit von den enthaltenen helikal gefalteten terminalen Domänen dominiert.

2.2. PRODUKTION UND UNTERSUCHUNG VON eMaSp1s SEIDENFASERN

Teilarbeit III liefert einen Überblick zu den vielfältigen Möglichkeiten, rekombinant hergestellte Spinnenseidenproteine zu unterschiedlichen Morphologien zu verarbeiten. Eine der spannendsten Forschungsfelder ist dabei die Herstellung von Fasern (Teilarbeit III, Kapitel 10.3.1), wobei es kürzlich mittels Nassspinnverfahren gelungen ist, Spinnenseidenfasern aus dem rekombinanten N1L(AQ)₁₂NR3 (ein 76 kDa großes MaSp2 Protein, bestehend aus 12 Wiederholungseinheiten der Kerndomäne von *Araneus diadematus* fibroin 3 (ADF3), flankiert von N-terminaler (N1L) und C-terminaler (NR3) Domäne) herzustellen, die in ihren mechanischen Eigenschaften vergleichbar zu ihrem natürlichen Vorbild waren.^[133] Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte nun auch das Potential von eMaSp1s zur Faserherstellung untersucht werden (Teilarbeit I). Da gezeigt wurde,^[112, 133-134] dass die beiden terminalen Domänen für die Proteinassemblierung eine entscheidende Rolle spielen (Teilarbeit IV), wurde eMaSp1s als Volllängenkonstrukt verwendet.

Für die Herstellung hochkonzentrierter wässriger Spinnlösungen wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Ein klassischer Ansatz, bei dem eine Proteinlösung schrittweise aufkonzentriert wird (*CSD, classical spinning dope*) und ein biomimetischer Ansatz, der sich die Selbstassemblierungseigenschaften von Spinnenseidenproteinen mit C-terminaler Domäne zu Nutze macht.^[133] Dabei trennt sich die Proteinlösung in eine Phase niedriger und einer Phase hoher Proteinkonzentration, welche mizellenartige Proteinstrukturen enthält (Abbildung 14) und als Spinnlösung verwendet werden kann (*BSD, biomimetic spinning dope*). Hierbei zeigte sich eine erste Besonderheit von eMaSp1s: Obwohl das Protein beide terminalen Domänen enthält, zeigte sich in Lösung keine Phasenseparation, was mutmaßlich auf das veränderte Verhältnis der Größe von Kerndomäne und Termini und die veränderte Aminosäurezusammensetzung (Ladungen, hohe Löslichkeit) zurückzuführen ist. Daher wurde eMaSp1s alleine nur aus CSD versponnen. Allerdings war eine Mischung von

eMaSp1s und N1L(AQ)₁₂NR3 im molaren Verhältnis von 1:1 fähig zur Phasenseparation und zum Verspinnen aus BSD.

Beim Nassspinnen wird die Spinnlösung durch eine dünne Kanüle in ein Fällbad aus 70-prozentigem Isopropanol gedrückt, in welchem die Proteinlösung ausfällt und sich eine feste Faser bildet. eMaSp1s konnte aus CSD und als Mischung mit N1L(AQ)₁₂NR3 aus BSD erfolgreich zu Seidenfasern versponnen werden. Mittels FTIR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass sich die Sekundärstrukturanteile von eMaSp1s nach Verspinnen deutlich verschieben (Abbildung 13).

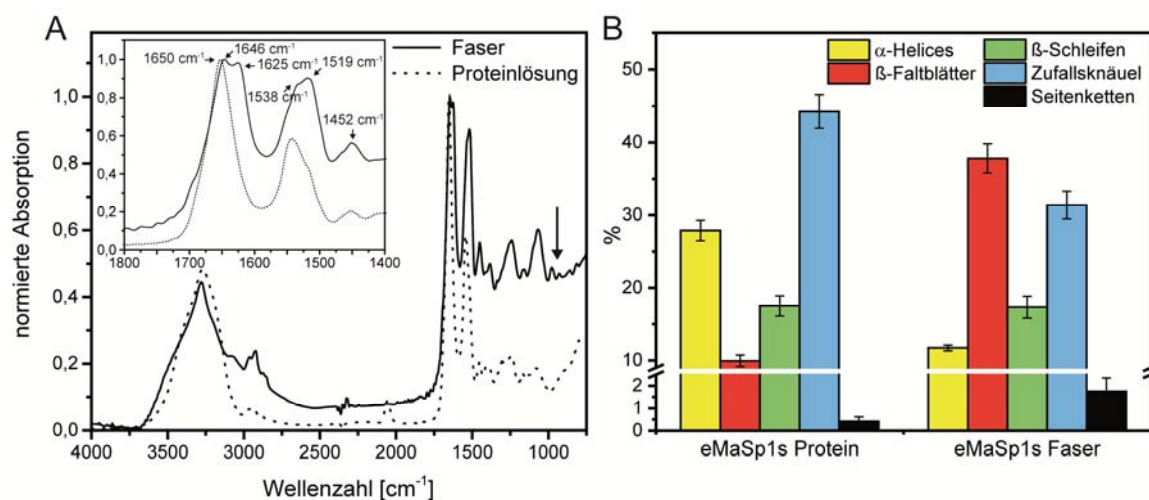


Abbildung 13: Vergleich der (A) FTIR-Spektren und (B) Sekundärstrukturanteile (mittels Fourier-Selbstentfaltung bestimmt^[323]) von löslichem eMaSp1s und nassgesponnenen eMaSp1s-Fasern. Die kleine Grafik in Teil A der Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Amid I und II Region zwischen 1800 und 1400 cm^{-1} . Modifiziert nach ^[103] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Das Absorptionsmaximum im Amid I Bereich bei 1650 cm^{-1} (α -Helix, Zufallsknäuel) verschiebt sich in Richtung des charakteristischen β -Faltblattbereiches bei 1625 cm^{-1} . Ebenso zeigt das typische β -Faltblattsignal im Amid II Bereich bei 1519 cm^{-1} einen deutlichen Anstieg seiner Intensität. Mittels Fourier-Selbstentfaltung (FSD) konnte der Prozentsatz der Sekundärstrukturanteile bestimmt werden. Die deutliche Abnahme des Signals in den helikalen Bereichen (von 28 auf 12 %) lässt darauf schließen, dass diese in der Faser zu β -Faltblattstrukturen umgewandelt wurden, obwohl die Polyalanin-Bereiche in eMaSp1s bis auf einen einzigen Abschnitt deutlich kürzer und zudem inhomogener verteilt sind als in anderen MaSp Proteinen. Der Anteil der β -Faltblattstrukturen, die für die

Zugfestigkeit der Faser verantwortlich sind, stieg von 10 % in Lösung auf 38 % in der MaSp1s-Faser (Teilarbeit I, Abbildung 4).

Direkt im Anschluss an das Nassspinnen wurden die Fasern manuell in Lösung nachgestreckt, was durch die daraus resultierende Ausrichtung der β -Faltblattstrukturen entlang der Faserachse einen signifikanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der resultierenden Fasern hat (Tabelle 2).^[133, 235]

Tabelle 2: Mechanische Eigenschaften verschiedener ungestreckter und nachgestreckter Spinnenseidenfasern, die ausgehend von klassischen und biomimetischen Spinnlösungen hergestellt wurden. Die Zugversuche wurden bei 20°C und 30 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Modifiziert nach ^[103] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

	klassische Spinnlösung			
	N1L(AQ) ₁₂ NR3		eMaSp1s	
	0	600	0	400
Nachstreckung [%]	0	600	0	400
Durchmesser [μm]	75 ± 12	39 ± 9	77 ± 7	49 ± 7
Dehnbarkeit [%]	4 ± 2	109 ± 23	4 ± 1	102 ± 24
Zugfestigkeit [MPa]	25 ± 14	206 ± 68	31 ± 7	282 ± 66
Zähigkeit [MJm^{-3}]	$0,8 \pm 0,4$	116 ± 46	$0,9 \pm 0,2$	144 ± 44
Steifigkeit [GPa]	$0,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,3$

	biomimetische Spinnlösung			
	N1L(AQ) ₁₂ NR3		eMaSp1s / N1L(AQ) ₁₂ NR3 Mischung	
	0	600	0	600
Nachstreckung [%]	0	600	0	600
Durchmesser [μm]	155 ± 8	27 ± 10	66 ± 17	36 ± 9
Dehnbarkeit [%]	6 ± 1	110 ± 25	8 ± 2	93 ± 18
Zugfestigkeit [MPa]	13 ± 2	370 ± 59	23 ± 9	316 ± 103
Zähigkeit [MJm^{-3}]	$0,3 \pm 0,1$	189 ± 33	$0,8 \pm 0,1$	142 ± 50
Steifigkeit [GPa]	$0,5 \pm 0,1$	4 ± 1	$0,8 \pm 0,2$	$1 \pm 0,4$

Hergestellte eMaSp1s-Fasern (CSD) konnten bis zu 400 % nachgestreckt werden, während die Mischfasern (BSD) auf bis zu 600 % ihrer ursprünglichen Länge gestreckt werden konnten. Obwohl das MaSp1s Protein deutlich kleiner und die Durchmesser der gesponnenen Fasern im Schnitt etwas größer waren, ergaben sich für die mechanischen Eigenschaften der eMaSp1s-Fasern aus CSD überraschenderweise geringfügig höhere Werte als für N1L(AQ)₁₂NR3 aus CSD. Bei vergleichbarer Dehnbarkeit (102 zu 109 %) zeigten die eMaSp1s-Fasern eine bessere Zugfestigkeit und Steifigkeit, was zu einer signifikant höheren Zähigkeit (144 MJm^{-3}) führte. Diese Eigenschaft ist am wahrscheinlichsten auf einen höheren Gesamt-Alaninanteil in der Kerndomäne von eMaSp1s (29 % zu 16 %) und das Vorhandensein von 11,5 % geladenen Aminosäuren (ionische/elektrostatische Wechselwirkungen haben im Durchschnitt eine höhere Bindungsenergie als kovalente Wechselwirkungen^[324]) im Vergleich zu N1L(AQ)₁₂NR3

zurückzuführen. Bei den biomimetischen Spinnlösungen zeigten die Mischfasern aus eMaSp1s und N1L(AQ)₁₂NR3 geringfügig schlechtere mechanische Werte als reine N1L(AQ)₁₂NR3-Fasern was zu vorherigen Studienresultaten mit MaSp1/MaSp2 Mischungen passt^[325] und wahrscheinlich darin begründet liegt, dass eMaSp1s durch Einlagerung in die Struktur von N1L(AQ)₁₂NR3 dessen perfekte Ausrichtung während der Faserassemblierung stört (Abbildung 14).

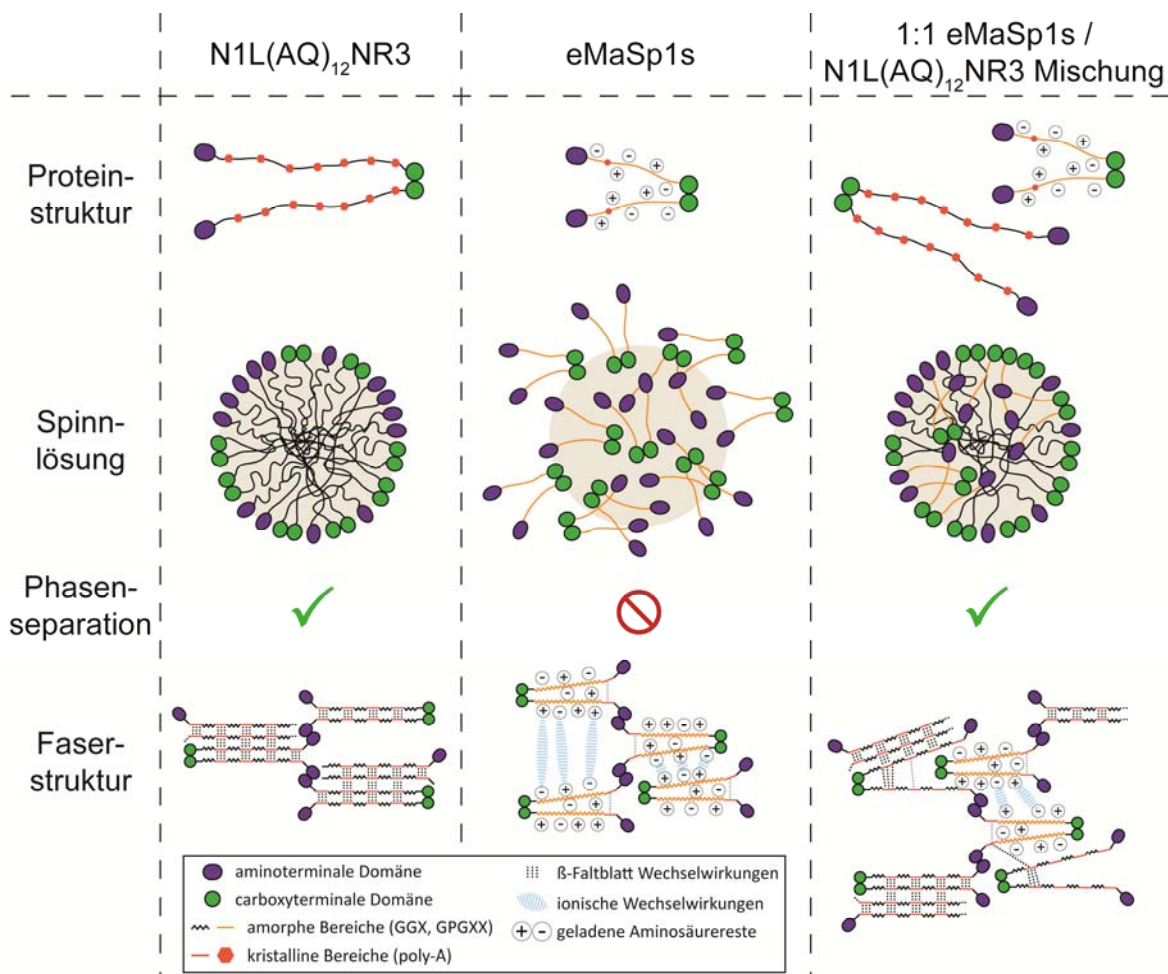


Abbildung 14: Schematisches Modell zur vorausgesagten molekularen Struktur der verschiedenen Spinnenseidenproteine und einer Mischung während unterschiedlicher Phasen der Faserherstellung. N1L(AQ)₁₂NR3 besitzt eine 47 kDa große hochrepetitive, ungeladene Kerndomäne, während die nicht repetitive Kerndomäne von eMaSp1s nur 17 kDa groß ist und 22 geladene Aminosäuren besitzt. Modifiziert nach ^[103] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Vergangene Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die mechanischen Eigenschaften von Spinnenseidenfasern von der Aminosäurezusammensetzung, vor allem aber vom

Molekulargewicht der zugrundeliegenden Protein-Kerndomäne abhängen.^[224, 326] Die hier gezeigten Resultate zu den Experimenten mit dem in seinem Aufbau neuartigen kleinen Seidenprotein eMaSp1s lassen die Schlussfolgerung zu, dass neben dem Molekulargewicht und der Proteinsequenz vor allem die terminalen Domänen für die Herstellung einer stabilen Spinnlösung und die Faserassemblierung von enormer Bedeutung sind.

2.3. ANALYSE UND VERARBEITUNG VON eMaSp1s HYDROGELEN

Das rekombinant hergestellte Spinnenseidenprotein eADF4(C16) wurde bereits in früheren Studien erfolgreich zu Hydrogelen verarbeitet.^[241-243] Die Assemblierung beruht auf der konzentrationsabhängigen Ausbildung von β -Faltblatt-reichen Fibrillen, welche die Hydrogele physikalisch quervernetzen.^[241, 327] Aufgrund ihrer rheologischen Eigenschaften, welche die Verarbeitung mittels Dispensplotten ermöglichen,^[243] sind Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen vielversprechende Materialien im Bereich biomedizinischer Anwendungen.^[276] In Teilarbeit II sollte das Potential von eMaSp1s zur Bildung von stabilen Hydrogelen, deren Charakterisierung und Verarbeitung betrachtet werden.

eMaSp1s Hydrogele mit Proteinkonzentrationen zwischen 30 und 70 mg/ml konnten mittels PEG-Dialyse und anschließender Inkubation bei 37°C nach dem Protokoll von Schacht et al. für das rekombinante Protein eADF4(C16)^[241] erfolgreich hergestellt werden (Abbildung 15A). Die Dauer der Gelbildung war unabhängig von der Proteinkonzentration und nach knapp 60 Stunden vollständig abgeschlossen. Die resultierenden Hydrogele konnten stabil mehrere Tage gelagert werden und blieben auch bei Puffer oder Wasserzugabe intakt. eMaSp1s ist somit eines der wenigen rekombinanten Spinnenseidenproteine, welches bislang sowohl zu stabilen Fasern (Teilarbeit I)^[103] als auch zu Hydrogelen (Teilarbeit II)^[328] verarbeitet werden kann.

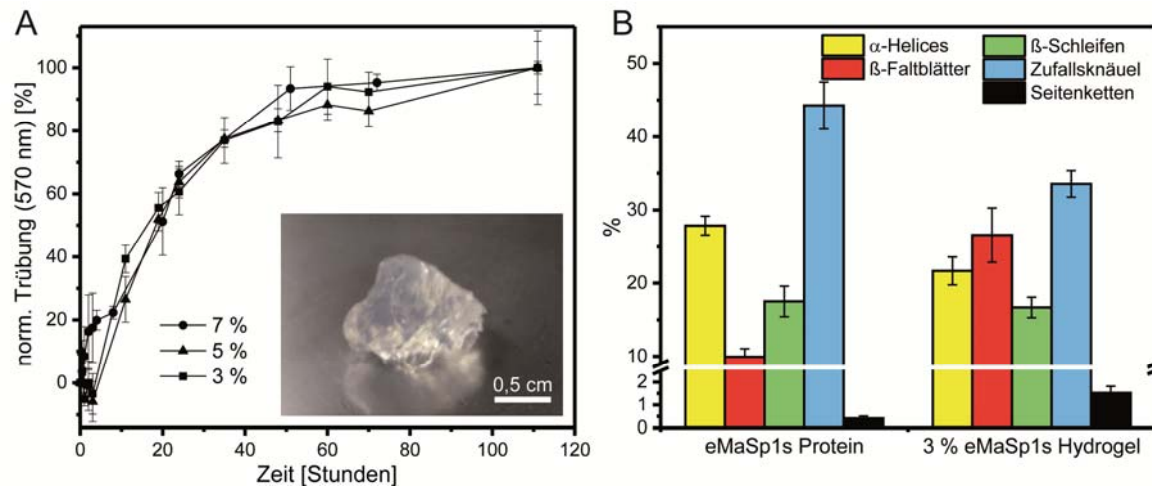


Abbildung 15: Herstellung und Charakterisierung der eMaSp1s Hydrogele. (A) Mittels Trübungsmessung (570 nm) verfolgte Gelierungskinetik von eMaSp1s Lösungen unterschiedlicher Konzentration bei 37 °C. Die kleine Grafik zeigt ein 3 % (w/v) eMaSp1s Hydrogel nach 72 h Inkubation. (B) Sekundärstrukturanteile wurden mittels Fourier-Selbstentfaltung zugrundeliegender FTIR-Spektren eines 3 % eMaSp1s Hydrogels bestimmt. Modifiziert nach ^[328] mit freundlicher Genehmigung des Verlages John Wiley and Sons.

Die Analyse der Sekundärstrukturanteile von resuspendiertem Hydrogel im Vergleich zum gefriergetrockneten Ausgangsprotein mittels FTIR zeigte einen deutlichen Anstieg des β -Faltblattanteils nach Gelbildung, was mit den publizierten Ergebnissen in der Fachliteratur übereinstimmt.^[241, 329] Der β -Faltblattanteil stieg von 9 auf 27 %, während der helikale Anteil von 28 auf 22 % und der Zufallsknäuel-Anteil von 44 auf 35 % sank (Abbildung 15B). Die Ausbildung der β -Faltblattstrukturen geschieht mutmaßlich im Bereich der vormals unstrukturierten Kerndomäne von eMaSp1s, während die terminalen Domänen ihre helikale Struktur während der Gelbildung beibehalten.

Die Bildung von β -Faltblatt-reichen Fibrillen während der Gelbildung konnte mittels Mikroskopie- und Färbemethoden nachgewiesen werden. So zeigten sich bei Untersuchung mittels TEM fibrilläre Strukturen mit einer Länge von 200-500 nm, einem Durchmesser von 15 nm bei mittels AFM bestimmter Höhe von 1,0-1,3 nm, was mit den publizierten Werten von rekombinanten Spinnenseidenfibrillen übereinstimmt.^[267] Auch durch Congo Rot und Thioflavin T-Färbemethoden konnten die β -faltblattreichen Fibrillen nachgewiesen werden (Teilarbeit II, Abbildung 3).

Die rheologisch bestimmten mechanischen Eigenschaften von eMaSp1s Hydrogelen lagen bei gleicher Konzentration leicht unter denen von eADF4(C16)^[241], zeigten aber ebenso scherverdünnendes Verhalten, womit die Grundvoraussetzung zur Verarbeitung mittels

Dispensdrucken gegeben ist. Aufgrund ihrer Elastizitätsmoduli von unter 10 kPa (Teilarbeit II, Abbildung 4), die im optimalen Bereich zur Verwendung als weiche Hydrogele im Bereich Geweberegeneration oder Wirkstofffreisetzung liegt,^[241] und der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu einer anderen Studie,^[322] wurden die nachfolgenden Experimente mit 3 % (w/v) eMaSp1s Hydrogelen durchgeführt.

Überraschenderweise zeigte ein Hydrogel aus einer äquimolaren Mischung von eMaSp1s und eADF4(C16) vor dem Drucken verbesserte mechanische Eigenschaften im Vergleich zu den Hydrogelen aus einem einzigen der beiden Proteine. Auf Basis der Erkenntnisse durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hydrogele und Analyse der thermischen Stabilität scheint dieser Effekt nicht das Ergebnis von einer molekularen Interaktion beider Proteine, sondern vielmehr einer Verflechtung der unterschiedlichen Morphologien während der gemeinsamen Gelbildung zu sein (Teilarbeit II, Abbildung 5).

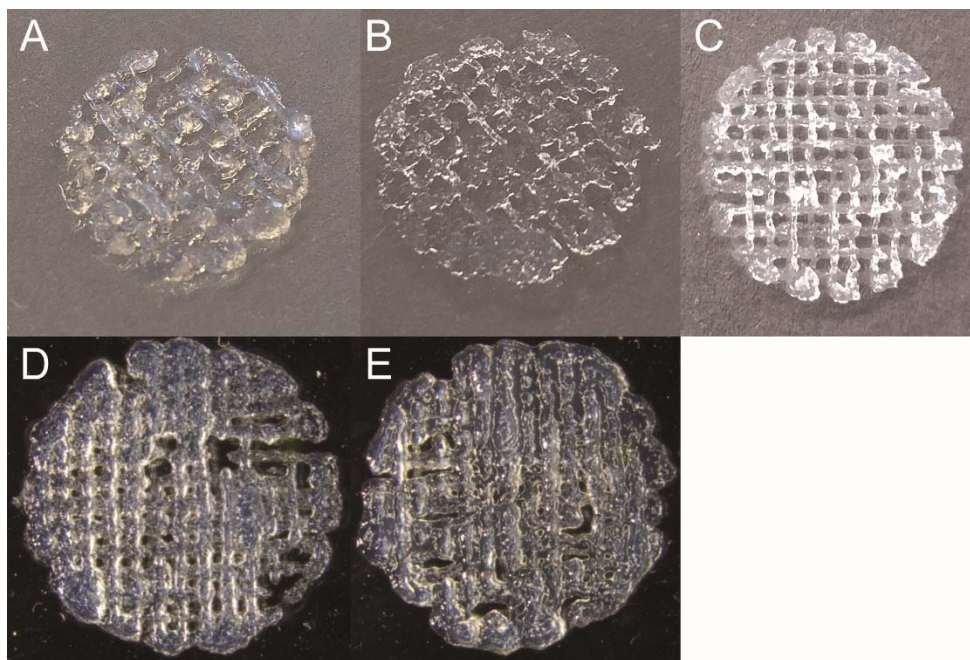


Abbildung 16: Dispensplotten von zweischichtigen Gerüsten aus rekombinanten Spinnenseidenhydrogelen (A, D) 3 % (w/v) 1:1 eADF4(C16): eMaSp1s Mischung, (B, E) 3 % (w/v) eMaSp1s und (C) 3 % (w/v) eADF4(C16) als Referenz. (A, B, C) Lichtbild- und (D, E) stereomikroskopische Aufnahmen. Der Durchmesser der Konstrukte beträgt 1,2 cm. Modifiziert nach ^[328] mit freundlicher Genehmigung des Verlages John Wiley and Sons.

eMaSp1s und die Mischung aus eMaSp1s und eADF4(C16) wurden nach vergleichbaren Parametern wie für eADF4(C16)^[243] mittels Dispensplotten verarbeitet (Abbildung 16).

Allerdings waren die eMaSp1s und Misch-Hydrogele trotz vergleichbarem Scherverdünnungsverhalten und höherer Scherbelastungstoleranz der Mischung im Gegensatz zu gedrucktem eADF(C16) deutlich weniger formstabil und somit im Dispensdruck deutlich schwieriger zu handhaben. Zeitabhängige Messungen des Speicher- und Verlustmoduls vor und nach der oszillatorischen Vorformung des Hydrogels (Simulation des Druckprozesses) zeigten im Bereich niedriger Scherraten (0.2 s^{-1}), dass eADF4(C16) nach dem Druck seine mechanischen Eigenschaften innerhalb relativ kurzer Zeit wiedererlangt, während eMaSp1s und die Mischung in diesem Zeitabschnitt keine Erholung zeigen (Teilarbeit II, Abbildung 7A, 7C). Bei höheren Scherraten (40 s^{-1}) zeigt neben eADF4(C16) auch die Mischung eine Erholung in den Werten ihres Speicher- und Verlustmoduls (Teilarbeit II, Abbildung 7B, 7D).

Betrachtet man jedoch die Entwicklung der mechanischen Eigenschaften über einen längeren Zeitraum nach dem Dispensdruck, so nehmen die maximalen Fließspannungswerte aller verwendeten Hydrogele unmittelbar nach dem Druck zwar ab, regenerieren sich aber deutlich erkennbar über den Zeitraum von mehreren Tagen.

Aufgrund dieser mechanischen Charakteristik sind eMaSp1s Hydrogele zwar nicht geeignet für Anwendungen, bei denen es wichtig ist, dass das Material zeitnah nach dem Druckvorgang seine Formstabilität wiedererlangt, stellen aber potentielle Kandidaten für andere Anwendungsbereiche wie injizierbare Wirkstoffdepots dar.^[330]

3. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Vainker, S. J., Chinese silk : a cultural history, British Museum, London, **2004**.
- [2] Craig, C. L., Evolution of arthropod silks. *Annual review of entomology* **1997**, 42, 231-267.
- [3] Sutherland, T. D., Young, J. H., Weisman, S., Hayashi, C. Y. and Merritt, D. J., Insect silk: One name, many materials. *Annual review of entomology* **2010**, 55, 171-188.
- [4] Sehnal, F. and Sutherland, T., Silks produced by insect labial glands. *Prion* **2008**, 2, 145-153.
- [5] Lintz, E. S. and Scheibel, T. R., Dragline, Egg Stalk and Byssus: A Comparison of Outstanding Protein Fibers and Their Potential for Developing New Materials. *Advanced Functional Materials* **2013**, 23, 4467-4482.
- [6] Weisman, S., Okada, S., Mudie, S. T., Huson, M. G., Trueman, H. E., Sriskantha, A., Haritos, V. S. and Sutherland, T. D., Fifty years later: The sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk. *Journal of structural biology* **2009**, 168, 467-475.
- [7] Vollrath, F., Biology of spider silk. *International journal of biological macromolecules* **1999**, 24, 81-88.
- [8] World Spider Catalog, Version 18.0. *Natural History Museum Bern* **2017**.
- [9] Roemer, L. and Scheibel, T., The elaborate structure of spider silk – Structure and function of a natural high performance fiber. *Prion* **2008**, 2, 154-161.
- [10] Humenik, M., Scheibel, T. and Smith, A., Spider silk: understanding the structure-function relationship of a natural fiber. *Progress in molecular biology and translational science* **2011**, 103, 131-185.
- [11] Gerritsen, V. B., The tiptoe of an airbus. *Protein Spotlight, Swiss Prot* **2002**, 24, 1-2.
- [12] Lewis, R., Unraveling the weave of spider silk. *Bioscience* **1996**, 46, 636-638.
- [13] Dicko, C., Porter, D., Bond, J., Kenney, J. M. and Vollrath, F., Structural disorder in silk proteins reveals the emergence of elastomericity. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 216-221.
- [14] Shultz, J. W., The Origin Of The Spinning Apparatus In Spiders. *Biological Reviews* **1987**, 62, 89-113.
- [15] Kohler, T. and Vollrath, F., Thread biomechanics in the 2 orb-weaving spiders *Araneus diadematus* (Araneae, Araneidae) and *Uloborus walckenaerius* (Araneae, Uloboridae). *Journal of Experimental Zoology* **1995**, 271, 1-17.
- [16] Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. and Lewis, R., Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science* **2001**, 291, 2603-2605.
- [17] Tian, M. Z. and Lewis, R. V., Molecular characterization and evolutionary study of spider tubuliform (eggcase) silk protein. *Biochemistry* **2005**, 44, 8006-8012.
- [18] Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V., Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. *Science* **2000**, 287, 1477-1479.
- [19] Vollrath, F. and Knight, D. P., Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **2001**, 410, 541-548.
- [20] Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H. and Gosline, J. M., Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* **1996**, 272, 112-115.
- [21] Heidebrecht, A. and Scheibel, T., Recombinant production of spider silk proteins. *Advances in applied microbiology* **2013**, 82, 115-153.

- [22] Eisoldt, L., Smith, A. and Scheibel, T., Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today* **2011**, *14*, 80-86.
- [23] Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. and Savage, K. N., The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function. *Journal of Experimental Biology* **1999**, *202*, 3295-3303.
- [24] Aprhisiart, A. and Vollrath, F., Design-Features of the Orb Web of the Spider, *Araneus-Diadematus*. *Behavioral Ecology* **1994**, *5*, 280-287.
- [25] Andersen, S. O., Amino acid composition of spider silks. *Comparative Biochemistry and Physiology* **1970**, *35*, 705-711.
- [26] Gosline, J. M., Demont, M. E. and Denny, M. W., The Structure and Properties of Spider Silk. *Endeavour* **1986**, *10*, 37-43.
- [27] Heim, M., Keerl, D. and Scheibel, T., Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angewandte Chemie* **2009**, *48*, 3584-3596.
- [28] Madsen, B., Shao, Z. Z. and Vollrath, F., Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *International journal of biological macromolecules* **1999**, *24*, 301-306.
- [29] Guinea, G. V., Elices, M., Plaza, G. R., Perea, G. B., Daza, R., Riekkel, C., Agullo-Rueda, F., Hayashi, C., Zhao, Y. and Perez-Rigueiro, J., Minor Ampullate Silks from *Nephila* and *Argiope* Spiders: Tensile Properties and Microstructural Characterization. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2087-2098.
- [30] Dicko, C., Knight, D., Kenney, J. M. and Vollrath, F., Secondary structures and conformational changes in flagelliform, cylindrical, major, and minor ampullate silk proteins. Temperature and concentration effects. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2105-2115.
- [31] Scheibel, T., Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial cell factories* **2004**, *3*, 14.
- [32] Opell, B. D. and Bond, J. E., Capture thread extensibility of orb-weaving spiders: testing punctuated and associative explanations of character evolution. *Biological Journal of the Linnean Society* **2000**, *70*, 107-120.
- [33] Sahni, V., Blackledge, T. A. and Dhinojwala, A., Viscoelastic solids explain spider web stickiness. *Nature communications* **2010**, *1*, 1-4.
- [34] Tillinghast, E. K. and Townley, M. A., Silk Glands of Araneid Spiders - Selected Morphological and Physiological-Aspects. *Silk Polymers* **1994**, *544*, 29-44.
- [35] Hu, X. Y., Yuan, J., Wang, X. D., Vasanthavada, K., Falick, A. M., Jones, P. R., La Mattina, C. and Vierra, C. A., Analysis of aqueous glue coating proteins on the silk fibers of the cob weaver, *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3294-3303.
- [36] Hawthorn, A. C. and Opell, B. D., Evolution of adhesive mechanisms in cribellar spider prey capture thread: evidence for van der Waals and hygroscopic forces. *Biological Journal of the Linnean Society* **2002**, *77*, 1-8.
- [37] Hawthorn, A. C. and Opell, B. D., Van-der-Waals and hygroscopic forces of adhesion generated by spider capture threads. *Journal of Experimental Biology* **2003**, *206*, 3905-3911.
- [38] Blackledge, T. A. and Hayashi, C. Y., Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775). *Journal of Experimental Biology* **2006**, *209*, 2452-2461.
- [39] Hayashi, C. Y., Blackledge, T. A. and Lewis, R. V., Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: Uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Molecular biology and evolution* **2004**, *21*, 1950-1959.

- [40] Van Nimmen, E., Gellynck, K., Gheysens, T., Van Langenhove, L. and Mertens, J., Modeling of the stress-strain behavior of egg sac silk of the spider *Araneus diadematus*. *Journal of Arachnology* **2005**, 33, 629-639.
- [41] Candelas, G. C., Ortiz, A. and Molina, C., The cylindrical or tubiliform glands of *Nephila clavipes*. *The Journal of experimental zoology* **1986**, 237, 281-285.
- [42] Blasingame, E., Tuton-Blasingame, T., Larkin, L., Falick, A. M., Zhao, L., Fong, J., Vaidyanathan, V., Visperas, A., Geurts, P., Hu, X. Y., La Mattina, C. and Vierra, C., Pyriform Spidroin 1, a Novel Member of the Silk Gene Family That Anchors Dragline Silk Fibers in Attachment Discs of the Black Widow Spider, *Latrodectus hesperus*. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284, 29097-29108.
- [43] Perry, D. J., Bittencourt, D., Siltberg-Liberles, J., Rech, E. L. and Lewis, R. V., Piriform Spider Silk Sequences Reveal Unique Repetitive Elements. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3000-3006.
- [44] Geurts, P., Zhao, L., Hsia, Y., Gnesa, E., Tang, S., Jeffery, F., La Mattina, C., Franz, A., Larkin, L. and Vierra, C., Synthetic spider silk fibers spun from pyriform spidroin 2, a glue silk protein discovered in orb-weaving spider attachment discs. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3495-3503.
- [45] Jelinski, L. W., Blye, A., Liivak, O., Michal, C., LaVerde, G., Seidel, A., Shah, N. and Yang, Z., Orientation, structure, wet-spinning, and molecular basis for supercontraction of spider dragline silk. *International journal of biological macromolecules* **1999**, 24, 197-201.
- [46] Boutry, C. and Blackledge, T. A., Evolution of supercontraction in spider silk: structure-function relationship from tarantulas to orb-weavers. *Journal of Experimental Biology* **2010**, 213, 3505-3514.
- [47] Blackledge, T. A., Boutry, C., Wong, S. C., Baji, A., Dhinojwala, A., Sahni, V. and Agnarsson, I., How super is supercontraction? Persistent versus cyclic responses to humidity in spider dragline silk. *Journal of Experimental Biology* **2009**, 212, 1980-1988.
- [48] Work, R. W. and Morosoff, N., A Physicochemical Study of the Supercontraction of Spider Major Ampullate Silk Fibers. *Textile Research Journal* **1982**, 52, 349-356.
- [49] Work, R. W., Dimensions, birefringences, and force-elongation behavior of Major and Minor Ampullate silk fibers from orb-web spinning spiders – Effects of wetting on these properties. *Textile Research Journal* **1977**, 47, 650-662.
- [50] Nova, A., Keten, S., Pugno, N. M., Redaelli, A. and Buehler, M. J., Molecular and nanostructural mechanisms of deformation, strength and toughness of spider silk fibrils. *Nano letters* **2010**, 10, 2626-2634.
- [51] Work, R. W., Duality in Major Ampullate Silk and Precursive Material from Orb-Web-Building Spiders (Araneae). *Transactions of the American Microscopical Society* **1984**, 103, 113-121.
- [52] Li, S. F., McGhie, A. J. and Tang, S. L., New internal structure of spider dragline silk revealed by atomic force microscopy. *Biophysical journal* **1994**, 66, 1209-1212.
- [53] Augsten, K., Muhlig, P. and Herrmann, C., Glycoproteins and skin-core structure in *Nephila clavipes* spider silk observed by light and electron microscopy. *Scanning* **2000**, 22, 12-15.
- [54] Sponner, A., Vater, W., Monajembashi, S., Unger, E., Grosse, F. and Weisshart, K., Composition and hierarchical organisation of a spider silk. *PloS one* **2007**, 2, e998.
- [55] Schulz, S., Composition of the silk lipids of the spider *Nephila clavipes*. *Lipids* **2001**, 36, 637-647.
- [56] Liu, Y., Shao, Z. and Vollrath, F., Relationships between supercontraction and mechanical properties of spider silk. *Nature materials* **2005**, 4, 901-905.

- [57] Du, N., Liu, X. Y., Narayanan, J., Li, L. A., Lim, M. L. M. and Li, D. Q., Design of superior spider silk: From nanostructure to mechanical properties. *Biophysical journal* **2006**, *91*, 4528-4535.
- [58] Miller, L. D., Putthanarat, S., Eby, R. K. and Adams, W. W., Investigation of the nanofibrillar morphology in silk fibers by small angle X-ray scattering and atomic force microscopy. *International journal of biological macromolecules* **1999**, *24*, 159-165.
- [59] Grubb, D. T. and Jelinski, L. W., Fiber morphology of spider silk: The effects of tensile deformation. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2860-2867.
- [60] Anton, A. M., Heidebrecht, A., Mahmood, N., Beiner, M., Scheibel, T. and Kremer, F., Foundation of the Outstanding Toughness in Biomimetic and Natural Spider Silk. *Biomacromolecules* **2017**.
- [61] Sampath, S., Isdebski, T., Jenkins, J. E., Ayon, J. V., Henning, R. W., Orgel, J. P., Antipova, O. and Yarger, J. L., X-ray diffraction study of nanocrystalline and amorphous structure within major and minor ampullate dragline spider silks. *Soft matter* **2012**, *8*, 6713-6722.
- [62] Glišović, A., Vehoff, T., Davies, R. J. and Salditt, T., Strain Dependent Structural Changes of Spider Dragline Silk. *Macromolecules* **2008**, *41*, 390-398.
- [63] Hinman, M. B. and Lewis, R. V., Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 19320-19324.
- [64] van Beek, J. D., Hess, S., Vollrath, F. and Meier, B. H., The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10266-10271.
- [65] Papadopoulos, P., Solter, J. and Kremer, F., Structure-property relationships in major ampullate spider silk as deduced from polarized FTIR spectroscopy. *European Physical Journal E* **2007**, *24*, 193-199.
- [66] Xu, M. and Lewis, R. V., Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, *87*, 7120-7124.
- [67] Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R. and Scheibel, T., Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604-13612.
- [68] Brooks, A. E., Steinkraus, H. B., Nelson, S. R. and Lewis, R. V., An investigation of the divergence of major ampullate silk fibers from *Nephila clavipes* and *Argiope aurantia*. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3095-3099.
- [69] Blamires, S. J., Tseng, Y. H., Wu, C. L., Toft, S., Raubenheimer, D. and Tso, I. M., Spider web and silk performance landscapes across nutrient space. *Scientific reports* **2016**, *6*, 26383.
- [70] Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U. and Ittah, S., Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Current Biology* **2004**, *14*, 2070-2074.
- [71] Uversky, V. N. and Dunker, A. K., Understanding protein non-folding. *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* **2010**, *1804*, 1231-1264.
- [72] Lefevre, T., Boudreault, S., Cloutier, C. and Pezolet, M., Diversity of molecular transformations involved in the formation of spider silks. *Journal of molecular biology* **2011**, *405*, 238-253.
- [73] Xu, D., Yarger, J. L. and Holland, G. P., Exploring the backbone dynamics of native spider silk proteins in Black Widow silk glands with solution-state NMR spectroscopy. *Polymer* **2014**, *55*, 3879-3885.

- [74] Askarieh, G., Hedhammar, M., Nordling, K., Saenz, A., Casals, C., Rising, A., Johansson, J. and Knight, S. D., Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature* **2010**, 465, 236-238.
- [75] Hagn, F., Thamm, C., Scheibel, T. and Kessler, H., pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk – implications for fiber formation. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**.
- [76] Hagn, F., Eisoldt, L., Hardy, J. G., Vendrely, C., Coles, M., Scheibel, T. and Kessler, H., A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* **2010**, 465, 239-U131.
- [77] Doblhofer, E., Heidebrecht, A. and Scheibel, T., To spin or not to spin: spider silk fibers and more. *Applied microbiology and biotechnology* **2015**, 99, 9361-9380.
- [78] Ayoub, N. A., Garb, J. E., Tinghitella, R. M., Collin, M. A. and Hayashi, C. Y., Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PloS one* **2007**, 2, e514.
- [79] Winkler, S. and Kaplan, D. L., Molecular biology of spider silk. *Journal of biotechnology* **2000**, 74, 85-93.
- [80] Fu, C. J., Shao, Z. Z. and Vollrath, F., Animal silks: their structures, properties and artificial production. *Chemical Communications* **2009**, 6515-6529.
- [81] Lefevre, T., Rousseau, M. E. and Pezolet, M., Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Biophysical journal* **2007**, 92, 2885-2895.
- [82] Keerl, D. and Scheibel, T., Characterization of natural and biomimetic spider silk fibers. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* **2012**, 1, 83-94.
- [83] Simmons, A. H., Michal, C. A. and Jelinski, L. W., Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science* **1996**, 271, 84-87.
- [84] Parkhe, A. D., Seeley, S. K., Gardner, K., Thompson, L. and Lewis, R. V., Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *Journal of Molecular Recognition* **1997**, 10, 1-6.
- [85] Simmons, A., Ray, E. and Jelinski, L. W., Solid-State ¹³C NMR of Nephila clavipes dragline silk establishes structure and identity of crystalline regions. *Macromolecules* **1994**, 27, 5235-5237.
- [86] Thiel, B. L. and Viney, C., Beta sheets and spider silk. *Science* **1996**, 273, 1480-1481.
- [87] Hayashi, C. Y., Shipley, N. H. and Lewis, R. V., Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *International journal of biological macromolecules* **1999**, 24, 271-275.
- [88] Kummerlen, J., van Beek, J. D., Vollrath, F. and Meier, B. H., Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion nuclear magnetic resonance. *Macromolecules* **1996**, 29, 2920-2928.
- [89] Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V., Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *Journal of molecular biology* **1998**, 275, 773-784.
- [90] Dong, Z., Lewis, R. V. and Midaugh, C. R., Molecular mechanism of spider silk elasticity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1991**, 284, 53-57.
- [91] Hinman, M. B., Jones, J. A. and Lewis, R. V., Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends in biotechnology* **2000**, 18, 374-379.
- [92] Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V., Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 3152-3159.

- [93] Rising, A., Hjalms, G., Engstrom, W. and Johansson, J., N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriform spider silk proteins. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 3120-3124.
- [94] Bini, E., Knight, D. P. and Kaplan, D. L., Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *Journal of molecular biology* **2004**, 335, 27-40.
- [95] Garb, J. E., Ayoub, N. A. and Hayashi, C. Y., Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains. *BMC evolutionary biology* **2010**, 10, 243.
- [96] Challis, R. J., Goodacre, S. L. and Hewitt, G. M., Evolution of spider silks: conservation and diversification of the C-terminus. *Insect Molecular Biology* **2006**, 15, 45-56.
- [97] Otikovs, M., Chen, G., Nordling, K., Landreh, M., Meng, Q., Jornvall, H., Kronqvist, N., Rising, A., Johansson, J. and Jaudzems, K., Diversified Structural Basis of a Conserved Molecular Mechanism for pH-Dependent Dimerization in Spider Silk N-Terminal Domains. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2015**, 16, 1720-1724.
- [98] Eisoldt, L., Thamm, C. and Scheibel, T., The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers* **2012**, 97, 355-361.
- [99] Ittah, S., Michaeli, A., Goldblum, A. and Gat, U., A model for the structure of the C-terminal domain of dragline spider silk and the role of its conserved cysteine. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2768-2773.
- [100] Ittah, S., Cohen, S., Garty, S., Cohn, D. and Gat, U., An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1790-1795.
- [101] Beckwitt, R. and Arcidiacono, S., Sequence conservation in the C-terminal region of spider silk proteins (Spidroin) from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae). *The Journal of biological chemistry* **1994**, 269, 6661-6663.
- [102] Bittencourt, D., Oliveira, P. F., Prosdociimi, F. and Rech, E. L., Protein families, natural history and biotechnological aspects of spider silk. *Genetics and molecular research : GMR* **2012**, 11, 2360-2380.
- [103] Thamm, C. and Scheibel, T., Recombinant production, characterization, and fiber spinning of an engineered short major ampullate spidroin (MaSp1s). *Biomacromolecules* **2017**, 18, 1365-1372.
- [104] Jaudzems, K., Askarieh, G., Landreh, M., Nordling, K., Hedhammar, M., Jornvall, H., Rising, A., Knight, S. D. and Johansson, J., pH-dependent dimerization of spider silk N-terminal domain requires relocation of a wedged tryptophan side chain. *Journal of molecular biology* **2012**.
- [105] Bauer, J., Schaal, D., Eisoldt, L., Schweimer, K., Schwarzinger, S. and Scheibel, T., Acidic Residues Control the Dimerization of the N-terminal Domain of Black Widow Spiders' Major Ampullate Spidroin 1. *Scientific reports* **2016**, 6, 34442.
- [106] Gaines, W. A., Sehorn, M. G. and Marcotte, W. R., Spidroin N-terminal domain promotes a pH-dependent association of silk proteins during self-assembly. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 40745-40753.
- [107] Landreh, M., Askarieh, G., Nordling, K., Hedhammar, M., Rising, A., Casals, C., Astorga-Wells, J., Alvelius, G., Knight, S. D., Johansson, J., Jörnval, H. and Bergman, T., A pH-dependent dimer lock in spider silk protein. *Journal of molecular biology* **2010**, 404, 328-336.
- [108] Schroedinger, L., The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.74. **2015**.

- [109] Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. and McCammon, J. A., Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 10037-10041.
- [110] Kronqvist, N., Otikovs, M., Chmyrov, V., Chen, G., Andersson, M., Nordling, K., Landreh, M., Sarr, M., Jornvall, H., Wennmalm, S., Widengren, J., Meng, Q., Rising, A., Otzen, D., Knight, S. D., Jaudzems, K. and Johansson, J., Sequential pH-driven dimerization and stabilization of the N-terminal domain enables rapid spider silk formation. *Nature communications* **2014**, 5, 3254.
- [111] Kurut, A., Dicko, C. and Lund, M., Dimerization of Terminal Domains in Spiders Silk Proteins Is Controlled by Electrostatic Anisotropy and Modulated by Hydrophobic Patches. *ACS biomaterials science & engineering* **2015**, 1, 363-371.
- [112] Bauer, J. and Scheibel, T., Dimerization of the Conserved N-Terminal Domain of a Spider Silk Protein Controls the Self-Assembly of the Repetitive Core Domain. *Biomacromolecules* **2017**.
- [113] Atkison, J. H., Parnham, S., Marcotte, W. R., Jr. and Olsen, S. K., Crystal Structure of the Nephila clavipes Major Ampullate Spidroin 1A N-terminal Domain Reveals Plasticity at the Dimer Interface. *The Journal of biological chemistry* **2016**, 291, 19006-19017.
- [114] Gronau, G., Qin, Z. and Buehler, M. J., Effect of sodium chloride on the structure and stability of spider silk's N-terminal protein domain. *Biomaterials science* **2013**, 1, 276-284.
- [115] Wallace, J. A. and Shen, J. K., Unraveling a trap-and-trigger mechanism in the pH-sensitive self-assembly of spider silk proteins. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, 3, 658-662.
- [116] Schwarze, S., Zwettler, F. U., Johnson, C. M. and Neuweiler, H., The N-terminal domains of spider silk proteins assemble ultrafast and protected from charge screening. *Nature communications* **2013**, 4, 2815.
- [117] Hedhammar, M., Rising, A., Grip, S., Martinez, A. S., Nordling, K., Casals, C., Stark, M. and Johansson, J., Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthenops australis*: Implications for fiber formation. *Biochemistry* **2008**, 47, 3407-3417.
- [118] Sponner, A., Unger, E., Grosse, F. and Weisshart, K., Conserved C-termini of spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 840-845.
- [119] Sponner, A., Vater, W., Rommerskirch, W., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F. and Weisshart, K., The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 338, 897-902.
- [120] Exler, J. H., Hummerich, D. and Scheibel, T., The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 3559-3562.
- [121] Vollrath, F. and Knight, D. P., Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. *International journal of biological macromolecules* **1999**, 24, 243-249.
- [122] Andersson, M., Chen, G., Otikovs, M., Landreh, M., Nordling, K., Kronqvist, N., Westermarck, P., Jornvall, H., Knight, S., Ridderstrale, Y., Holm, L., Meng, Q., Jaudzems, K., Chesler, M., Johansson, J. and Rising, A., Carbonic anhydrase generates CO₂ and H⁺ that drive spider silk formation via opposite effects on the terminal domains. *PLoS biology* **2014**, 12, e1001921.

- [123] Vollrath, F., Knight, D. P. and Hu, X. W., Silk production in a spider involves acid bath treatment. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **1998**, 265, 817-820.
- [124] Ohgushi, M. and Wada, A., 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS letters* **1983**, 164, 21-24.
- [125] Selkoe, D. J., Folding proteins in fatal ways. *Nature* **2003**, 426, 900-904.
- [126] Gauthier, M., Leclerc, J., Lefevre, T., Gagne, S. M. and Auger, M., Effect of pH on the structure of the recombinant C-terminal domain of *Nephila clavipes* dragline silk protein. *Biomacromolecules* **2014**, 15, 4447-4454.
- [127] Jin, H. J. and Kaplan, D. L., Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* **2003**, 424, 1057-1061.
- [128] Rammensee, S., Slotta, U., Scheibel, T. and Bausch, A. R., Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 6590-6595.
- [129] Vezy, C., Hermanson, K. D., Scheibel, T. and Bausch, A. R., Interfacial rheological properties of recombinant spider-silk proteins. *Biointerphases* **2009**, 4, 43-46.
- [130] Grip, S., Johansson, J. and Hedhammar, M., Engineered disulfides improve mechanical properties of recombinant spider silk. *Protein Science* **2009**, 18, 1012-1022.
- [131] Wang, S., Huang, W. and Yang, D., Structure and function of C-terminal domain of aciniform spidroin. *Biomacromolecules* **2014**, 15, 468-477.
- [132] Stark, M., Grip, S., Rising, A., Hedhammar, M., Engstrom, W., Hjalm, G. and Johansson, J., Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1695-1701.
- [133] Heidebrecht, A., Eisoldt, L., Diehl, J., Schmidt, A., Geffers, M., Lang, G. and Scheibel, T., Biomimetic fibers made of recombinant spidroins with the same toughness as natural spider silk. *Advanced materials* **2015**, 27, 2189-2194.
- [134] Bauer, J. and Scheibel, T., Conformational Stability and Interplay of Helical N- and C-Terminal Domains with Implications on Major Ampullate Spidroin Assembly. *Biomacromolecules* **2017**.
- [135] Stevenson, C. W., On the Spinning Organs and Architecture of *Evagrus*, a Theraphosid Araneid. *Biological Bulletin* **1908**, 15, 105-110.
- [136] Knight, D. P. and Vollrath, F., Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **1999**, 266, 519-523.
- [137] Andersson, M., Holm, L., Ridderstrale, Y., Johansson, J. and Rising, A., Morphology and Composition of the Spider Major Ampullate Gland and Dragline Silk. *Biomacromolecules* **2013**, 14, 2945-2952.
- [138] Bell, A. L. and Peakall, D. B., Changes in fine structure during silk protein production in the ampullate gland of the spider *Araneus sericatus*. *The Journal of Cell Biology* **1969**, 42, 284-295.
- [139] Plazaola, A. and Candelas, G. C., Stimulation of fibroin synthesis elicits ultrastructural modifications in spider silk secretory cells. *Tissue Cell* **1991**, 23, 277-284.
- [140] Rising, A. and Johansson, J., Toward spinning artificial spider silk. *Nature chemical biology* **2015**, 11, 309-315.
- [141] Vollrath, F. and Tillinghast, E. K., Glycoprotein glue beneath a spider webs aqueous coat. *Naturwissenschaften* **1991**, 78, 557-559.

- [142] Hijirida, D. H., Do, K. G., Michal, C., Wong, S., Zax, D. and Jelinski, L. W., ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophysical journal* **1996**, *71*, 3442-3447.
- [143] Chen, X., Knight, D. P. and Vollrath, F., Rheological characterization of *Nephila* spidroin solution. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 644-648.
- [144] Willcox, P. J., Gido, S. P., Muller, W. and Kaplan, D. L., Evidence of a cholesteric liquid crystalline phase in natural silk spinning processes. *Macromolecules* **1996**, *29*, 5106-5110.
- [145] Knight, D. and Vollrath, F., Hexagonal columnar liquid crystal in the cells secreting spider silk. *Tissue & Cell* **1999**, *31*, 617-620.
- [146] Kerkam, K., Viney, C., Kaplan, D. and Lombardi, S., Liquid Crystallinity of Natural Silk Secretions. *Nature* **1991**, *349*, 596-598.
- [147] Andersson, M., Johansson, J. and Rising, A., Silk Spinning in Silkworms and Spiders. *International journal of molecular sciences* **2016**, *17*.
- [148] Lee, S. H., Kim, J. J., Kim, S. S. and Kim, U. Y., Morphology and Performance of Polysulfone Hollow-Fiber Membrane. *Journal of Applied Polymer Science* **1993**, *49*, 539-548.
- [149] Wienk, I. M., Scholtenhuis, F. H. A. O., Vandenboomgaard, T. and Smolders, C. A., Spinning of Hollow-Fiber Ultrafiltration Membranes from a Polymer Blend. *Journal of Membrane Science* **1995**, *106*, 233-243.
- [150] Knight, D. P. and Vollrath, F., Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften* **2001**, *88*, 179-182.
- [151] Tillinghast, E. K., Chase, S. F. and Townley, M. A., Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, *Argiope aurantia* Lucas. *Journal of Insect Physiology* **1984**, *30*, 591-596.
- [152] Dicko, C., Vollrath, F. and Kenney, J. M., Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 704-710.
- [153] Eisoldt, L., Hardy, J. G., Heim, M. and Scheibel, T. R., The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *Journal of structural biology* **2010**.
- [154] Seidel, A., Liivak, O., Calve, S., Adaska, J., Ji, G. D., Yang, Z. T., Grubb, D., Zax, D. B. and Jelinski, L. W., Regenerated spider silk: Processing, properties, and structure. *Macromolecules* **2000**, *33*, 775-780.
- [155] Giesa, T., Perry, C. C. and Buehler, M. J., Secondary Structure Transition and Critical Stress for a Model of Spider Silk Assembly. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 427-436.
- [156] Perez-Rigueiro, J., Elices, M., Plaza, G., Real, J. I. and Guinea, G. V., The effect of spinning forces on spider silk properties. *Journal of Experimental Biology* **2005**, *208*, 2633-2639.
- [157] Lefevre, T., Boudreault, S., Cloutier, C. and Pezolet, M., Conformational and orientational transformation of silk proteins in the major ampullate gland of *Nephila clavipes* spiders. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2399-2407.
- [158] Viney, C., Huber, A. E., Dunaway, D. L., Kerkam, K. and Case, S. T., in *Silk Polymers. Materials Science and Biotechnology* (Eds.: Kaplan, D. L., Adams, W. W., Farmer, B., Viney, C.), American Chemical Society, Washington D.C., **1994**, pp. 120-136.
- [159] Hardy, J. G., Roemer, L. M. and Scheibel, T. R., Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* **2008**, *49*, 4309-4327.
- [160] Cranford, S. W., Tarakanova, A., Pugno, N. M. and Buehler, M. J., Nonlinear material behaviour of spider silk yields robust webs. *Nature* **2012**, *482*, 72-76.

- [161] Keten, S. and Buehler, M. J., Nanostructure and molecular mechanics of spider dragline silk protein assemblies. *Journal of the Royal Society Interface* **2010**, 7, 1709-1721.
- [162] Bratzel, G. and Buehler, M. J., Molecular mechanics of silk nanostructures under varied mechanical loading. *Biopolymers* **2012**, 97, 408-417.
- [163] Xiao, S., Stacklies, W., Debes, C. and Gräter, F., Force distribution determines optimal length of [small beta]-sheet crystals for mechanical robustness. *Soft matter* **2010**, DOI 10.1039/C1030SM00510J.
- [164] Bratzel, G. and Buehler, M. J., Sequence-structure correlations in silk: Poly-Ala repeat of *N. clavipes* MaSp1 is naturally optimized at a critical length scale. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **2012**, 7, 30-40.
- [165] Rabotyagova, O. S., Cebe, P. and Kaplan, D. L., Role of polyalanine domains in beta-sheet formation in spider silk block copolymers. *Macromolecular bioscience* **2010**, 10, 49-59.
- [166] Cetinkaya, M., Xiao, S. B. and Gräter, F., Effects of crystalline subunit size on silk fiber mechanics. *Soft matter* **2011**, 7, 8142-8148.
- [167] Oroudjev, E., Soares, J., Arcidiacono, S., Thompson, J. B., Fossey, S. A. and Hansma, H. G., Segmented nanofibers of spider dragline silk: Atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 6460-6465.
- [168] Keten, S., Xu, Z., Ihle, B. and Buehler, M. J., Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of beta-sheet crystals in silk. *Nature materials* **2010**, 9, 359-367.
- [169] Rohs, R., Etchebest, C. and Lavery, R., Unraveling proteins: a molecular mechanics study. *Biophysical journal* **1999**, 76, 2760-2768.
- [170] Brockwell, D. J., Paci, E., Zinober, R. C., Beddard, G. S., Olmsted, P. D., Smith, D. A., Perham, R. N. and Radford, S. E., Pulling geometry defines the mechanical resistance of a beta-sheet protein. *Nature structural biology* **2003**, 10, 731-737.
- [171] Qin, Z. and Buehler, M. J., Cooperative deformation of hydrogen bonds in beta-strands and beta-sheet nanocrystals. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **2010**, 82, 061906.
- [172] Keten, S. and Buehler, M. J., Geometric confinement governs the rupture strength of H-bond assemblies at a critical length scale. *Nano letters* **2008**, 8, 743-748.
- [173] Su, I. and Buehler, M. J., Nanomechanics of silk: the fundamentals of a strong, tough and versatile material. *Nanotechnology* **2016**, 27.
- [174] Termonia, Y., Molecular Modeling of Spider Silk Elasticity. *Macromolecules* **1994**, 27, 7378-7381.
- [175] Lee, S. M., Pippel, E., Gosele, U., Dresbach, C., Qin, Y., Chandran, C. V., Brauniger, T., Hause, G. and Knez, M., Greatly Increased Toughness of Infiltrated Spider Silk. *Science* **2009**, 324, 488-492.
- [176] Becker, N., Oroudjev, E., Mutz, S., Cleveland, J. P., Hansma, P. K., Hayashi, C. Y., Makarov, D. E. and Hansma, H. G., Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nature materials* **2003**, 2, 278-283.
- [177] Papadopoulos, P., Ene, R., Weidner, I. and Kremer, F., Similarities in the structural organization of major and minor ampullate spider silk. *Macromolecular Rapid Communications* **2009**, 30, 851-857.
- [178] Papadopoulos, P., Solter, J. and Kremer, F., Hierarchies in the structural organization of spider silk-a quantitative model. *Colloid and Polymer Science* **2009**, 287, 231-236.

- [179] Kratky, O. and Porod, G., Roentgenuntersuchung Geloester Fadenmolekuele. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1949**, 68, 1106-1122.
- [180] Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. and Gaub, H. E., Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **1997**, 276, 1109-1112.
- [181] Buehler, M. J. and Yung, Y. C., Deformation and failure of protein materials in physiologically extreme conditions and disease. *Nature materials* **2009**, 8, 175-188.
- [182] Ene, R., Papadopoulos, P. and Kremer, F., Partial deuteration probing structural changes in supercontracted spider silk. *Polymer* **2010**, 51, 4784-4789.
- [183] Ene, R., Papadopoulos, P. and Kremer, F., Quantitative analysis of infrared absorption coefficient of spider silk fibers. *Vibrational Spectroscopy* **2011**, 57, 207-212.
- [184] Gosline, J. M., Denny, M. W. and Demont, M. E., Spider Silk as Rubber. *Nature* **1984**, 309, 551-552.
- [185] Brown, C. P., Macleod, J., Amenitsch, H., Cacho-Nerin, F., Gill, H. S., Price, A. J., Traversa, E., Licoccia, S. and Rosei, F., The critical role of water in spider silk and its consequence for protein mechanics. *Nanoscale* **2011**, 3, 3805-3811.
- [186] Tarakanova, A. and Buehler, M. J., A materiomics approach to spider silk: Protein molecules to webs. *JOM* **2012**, 64, 214-225.
- [187] Alam, P., Protein unfolding versus beta-sheet separation in spider silk nanocrystals. *Advances in Natural Sciences-Nanoscience and Nanotechnology* **2014**, 5.
- [188] Giesa, T., Arslan, M., Pugno, N. M. and Buehler, M. J., Nanoconfinement of spider silk fibrils begets superior strength, extensibility, and toughness. *Nano letters* **2011**, 11, 5038-5046.
- [189] Colomban, P., Dinh, H. M., Bunsell, A. and Mauchamp, B., Origin of the variability of the mechanical properties of silk fibres: 1-The relationship between disorder, hydration and stress/strain behaviour. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, 43, 425-432.
- [190] Colomban, P. and Dinh, H. M., Origin of the variability of the mechanical properties of silk fibres: 2 The nanomechanics of single silkworm and spider fibres. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, 43, 1035-1041.
- [191] Han, L., Zhang, L., Zhao, T. F., Wang, Y. J. and Nakagaki, M., Analysis of a new type of major ampullate spider silk gene, MaSp1s. *International journal of biological macromolecules* **2013**, 56, 156-161.
- [192] Lubin, Y. D., The Predatory Behavior of Cyrtophora (Araneae, Araneidae). *Journal of Arachnology* **1980**, 8, 159-185.
- [193] Davies, V. T., An illustrated guide to the genera of orb-weaving spiders in Australia. *Memoirs of the Queensland Museum* **1988**, 25, 273-332.
- [194] Sheu, H. S. and Jean, Y. C., Water Improve Crystal Quality in Dragline of Cyrtophora Spider. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2013**, 60, 865-869.
- [195] Doleschall, L., Bijdrage tot de Kenntis der Arachniden van den Indischen Archipel. *Natuurkundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie* **1857**, 13, 339-434.
- [196] Berry, J. W., Notes on the Life-History and Behavior of the Communal Spider Cyrtophora-Moluccensis (Doleschall) (Araneae, Araneidae) in Yap, Caroline Islands. *Journal of Arachnology* **1987**, 15, 309-319.
- [197] Koh, J. K. H., Spiders of the Family Araneidae in Singapore Mangroves. *The Raffles Bulletin of Zoology* **1991**, 39, 169-182.

- [198] Lubin, Y. D., Adaptive Advantages and Evolution of Colony Formation in Cyrtophora (Araneae-Araneidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **1974**, 54, 321-&.
- [199] Yip, E. C., Powers, K. S. and Aviles, L., Cooperative capture of large prey solves scaling challenge faced by spider societies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 11818-11822.
- [200] Sharpe, R. V. and Aviles, L., Prey size and scramble vs. contest competition in a social spider: implications for population dynamics. *The Journal of animal ecology* **2016**, 85, 1401-1410.
- [201] Hoffman, C. R. and Avilés, L., Rain, predators, and spider sociality: a manipulative experiment *Behavioral Ecology* **2017**.
- [202] Strohm, E. and Bordon-Hauser, A., Advantages and disadvantages of large colony size in a halictid bee: the queen's perspective. *Behavioral Ecology* **2003**, 14, 546-553.
- [203] Uetz, G. W., Boyle, J., Hieber, C. S. and Wilcox, R. S., Antipredator benefits of group living in colonial web-building spiders: the 'early warning' effect. *Animal Behaviour* **2002**, 63, 445-452.
- [204] Gubler, U. and Hoffman, B. J., A Simple and Very Efficient Method for Generating cDNA Libraries. *Gene* **1983**, 25, 263-269.
- [205] Fox, L. R., Cannibalism in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1975**, 6, 87-106.
- [206] Guinea, G. V., Elices, M., Real, J. I., Gutierrez, S. and Perez-Rigueiro, J., Reproducibility of the tensile properties of spider (*Argiope trifasciata*) silk obtained by forced silking. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology* **2005**, 303A, 37-44.
- [207] Work, R. W. and Emerson, P. D., An Apparatus and Technique for the Forcible Silking of Spiders. *Journal of Arachnology* **1982**, 10, 1-10.
- [208] Ortlepp, C. S. and Gosline, J. M., Consequences of forced silking. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 727-731.
- [209] Barr, L. A., Fahnestock, S. R. and Yang, J. J., Production and purification of recombinant DP1B silk-like protein in plants. *Molecular Breeding* **2004**, 13, 345-356.
- [210] Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F. and Conrad, U., Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature biotechnology* **2001**, 19, 573-577.
- [211] Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A. and Conrad, U., Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic research* **2004**, 13, 51-57.
- [212] Menassa, R., Hong, Z., Karatzas, C. N., Lazaris, A., Richman, A. and Brandle, J., Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant Biotechnology Journal* **2004**, 2, 431-438.
- [213] Miao, Y. G., Zhang, Y. S., Nakagaki, K., Zhao, T. F., Zhao, A. C., Meng, Y., Nakagaki, M., Park, E. Y. and Maenaka, K., Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. *Applied microbiology and biotechnology* **2006**, 71, 192-199.
- [214] Ittah, S., Barak, N. and Gat, U., A proposed model for dragline spider silk self-assembly: insights from the effect of the repetitive domain size on fiber properties. *Biopolymers* **2010**, 93, 458-468.
- [215] Zhang, Y. S., Hu, J. H., Miao, Y. G., Zhao, A. C., Zhao, T. F., Wu, D. Y., Liang, L. F., Miihura, A. M., Shiomi, K., Kajiura, Z. and Nakagaki, M., Expression of EGFP-spider dragline silk fusion protein in BmN cells and larvae of silkworm showed the

- solubility is primary limit for dragline proteins yield. *Molecular Biology Reports* **2008**, 35, 329-335.
- [216] Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J. F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E. A., Soares, J. W. and Karatzas, C. N., Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* **2002**, 295, 472-476.
- [217] Grip, S., Rising, A., Nimmervoll, H., Storckenfeldt, E., McQueen-Mason, S. J., Pouchkina-Stantcheva, N., Vollrath, F., Engström, W. and Fernandez-Arias, A., Transient Expression of a Major Ampullate Spidroin 1 Gene Fragment from *Euprosthenops* sp. in Mammalian Cells. *Cancer Genomics - Proteomics* **2006**, 3, 83-87.
- [218] Fahnestock, S. R. and Bedzyk, L. A., Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology* **1997**, 47, 33-39.
- [219] Bogush, V. G., Sokolova, O. S., Davydova, L. I., Klinov, D. V., Sidoruk, K. V., Esipova, N. G., Neretina, T. V., Orchanskyi, I. A., Makeev, V. Y., Tumanyan, V. G., Shaitan, K. V., Debabov, V. G. and Kirpichnikov, M. P., A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **2009**, 4, 17-27.
- [220] Xu, H. T., Fan, B. L., Yu, S. Y., Huang, Y. H., Zhao, Z. H., Lian, Z. X., Dai, Y. P., Wang, L. L., Liu, Z. L., Fei, J. and Li, N., Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Animal Biotechnology* **2007**, 18, 1-12.
- [221] Perez-Rigueiro, J., Elices, M., Guinea, G. V., Plaza, G. R., Karatzas, C., Riekkel, C., Agullo-Rueda, F. and Daza, R., Bioinspired fibers follow the track of natural spider silk. *Macromolecules* **2011**, 44, 1166-1176.
- [222] Karatzas, C. N., Turner, J. D. and Karatzas, A.-L., C12N 15/11 A01K 67/027 ed., Canada, **1999**.
- [223] Prince, J. T., Mcgrath, K. P., Digirolamo, C. M. and Kaplan, D. L., Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry* **1995**, 34, 10879-10885.
- [224] Xia, X. X., Qian, Z. G., Ki, C. S., Park, Y. H., Kaplan, D. L. and Lee, S. Y., Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 14059-14063.
- [225] Arcidiacono, S., Mello, C., Kaplan, D., Cheley, S. and Bayley, H., Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* **1998**, 49, 31-38.
- [226] Fahnestock, S. R., Yao, Z. and Bedzyk, L. A., Microbial production of spider silk proteins. *Journal of biotechnology* **2000**, 74, 105-119.
- [227] Widmaier, D. M., Tullman-Ercek, D., Mirsky, E. A., Hill, R., Govindarajan, S., Minshull, J. and Voigt, C. A., Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers. *Molecular systems biology* **2009**, 5, 309.
- [228] Tokareva, O., Michalczechen-Lacerda, V. A., Rech, E. L. and Kaplan, D. L., Recombinant DNA production of spider silk proteins. *Microbial Biotechnology* **2013**, 6, 651-663.
- [229] Vendrely, C. and Scheibel, T., Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular bioscience* **2007**, 7, 401-409.
- [230] Roemer, L. and Scheibel, T., Basis for new material - Spider silk protein. *Chemie in Unserer Zeit* **2007**, 41, 306-314.
- [231] Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. and Mattern, M. R., SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification* **2005**, 43, 1-9.

- [232] Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. and Butt, T. R., Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Science* **2006**, *15*, 182-189.
- [233] Wohlrab, S., Thamm, C. and Scheibel, T., in *Biotechnology of Silk* (Eds.: Asakura, T., Miller, T.), Springer Netherlands, Dordrecht, **2014**, pp. 179-201.
- [234] Cao, H., Parveen, S., Ding, D., Xu, H., Tan, T. and Liu, L., Metabolic engineering for recombinant major ampullate spidroin 2 (MaSp2) synthesis in *Escherichia coli*. *Scientific reports* **2017**, *7*, 11365.
- [235] An, B., Hinman, M. B., Holland, G. P., Yarger, J. L. and Lewis, R. V., Inducing β -sheets formation in synthetic spider silk fibers by aqueous post-spin stretching. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2375-2381.
- [236] Teule, F., Furin, W. A., Cooper, A. R., Duncan, J. R. and Lewis, R. V., Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *Journal of Materials Science* **2007**, *42*, 8974-8985.
- [237] Lang, G., Jokisch, S. and Scheibel, T., Air filter devices including nonwoven meshes of electrospun recombinant spider silk proteins. *Journal of Visualized Experiments* **2013**, *75*, e50492.
- [238] Greiner, A. and Wendorff, J. H., Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 5670-5703.
- [239] Bini, E., Foo, C. W., Huang, J., Karageorgiou, V., Kitchel, B. and Kaplan, D. L., RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3139-3145.
- [240] Garg, K. and Bowlin, G. L., Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* **2011**, *5*, 13403.
- [241] Schacht, K. and Scheibel, T., Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules* **2011**.
- [242] Rammensee, S., Huemmerich, D., Hermanson, K. D., Scheibel, T. and Bausch, A. R., Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **2006**, *82*, 261-264.
- [243] Schacht, K., Jungst, T., Schweinlin, M., Ewald, A., Groll, J. and Scheibel, T., Biofabrication of cell-loaded 3D spider silk constructs. *Angewandte Chemie* **2015**, *54*, 2816-2820.
- [244] Chen, X., Knight, D. P., Shao, Z. Z. and Vollrath, F., Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy: effect of potassium ions on *Nephila* spidroin films. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14944-14950.
- [245] Huemmerich, D., Slotta, U. and Scheibel, T., Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Applied Physics a-Materials Science & Processing* **2006**, *82*, 219-222.
- [246] Borkner, C. B., Elsner, M. B. and Scheibel, T., Coatings and films made of silk proteins. *ACS applied materials & interfaces* **2014**, *6*, 15611-15625.
- [247] Slotta, U., Tammer, M., Kremer, F., Koelsch, P. and Scheibel, T., Structural analysis of spider silk films. *Supramolecular Chemistry* **2006**, *18*, 465-471.
- [248] Spiess, K., Wohlrab, S. and Scheibel, T., Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft matter* **2010**, *6*, 4168-4174.
- [249] Kim, U. J., Park, J., Joo Kim, H., Wada, M. and Kaplan, D. L., Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2775-2785.

- [250] Vepari, C. and Kaplan, D. L., Silk as a Biomaterial. *Progress in polymer science* **2007**, 32, 991-1007.
- [251] Schacht, K., Vogt, J. and Scheibel, T., Foams Made of Engineered Recombinant Spider Silk Proteins as 3D Scaffolds for Cell Growth. *ACS biomaterials science & engineering* **2016**, 2, 517-525.
- [252] Hermanson, K. D., Huemmerich, D., Scheibel, T. and Bausch, A. R., Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. *Advanced materials* **2007**, 19, 1810-+.
- [253] Bluem, C., Nichtl, A. and Scheibel, T., Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes. *Advanced Functional Materials* **2014**, 24, 763-768.
- [254] Slotta, U. K., Rammensee, S., Gorb, S. and Scheibel, T., An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, 4592-4594.
- [255] Elsner, M. B., Herold, H. M., Muller-Herrmann, S., Bargel, H. and Scheibel, T., Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles. *Biomaterials science* **2015**, 3, 543-551.
- [256] Lammel, A., Schwab, M., Hofer, M., Winter, G. and Scheibel, T., Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials* **2011**, 32, 2233-2240.
- [257] Liivak, O., Blye, A., Shah, N. and Jelinski, L. W., A microfabricated wet-spinning apparatus to spin fibers of silk proteins. Structure-property correlations. *Macromolecules* **1998**, 31, 2947-2951.
- [258] Slotta, U., Mougin, N., Roemer, L. and Leimer, A. H., Synthetic Spider Silk Proteins and Threads. *Chemical Engineering Progress* **2012**, 108, 43-49.
- [259] Zhou, G. Q., Shao, Z. Z., Knight, D. P., Yan, J. P. and Chen, X., Silk fibers extruded artificially from aqueous solutions of regenerated *Bombyx mori* silk Fibroin are tougher than their natural counterparts. *Advanced materials* **2009**, 21, 366-370.
- [260] Arcidiacono, S., Mello, C. M., Butler, M., Welsh, E., Soares, J. W., Allen, A., Ziegler, D., Laue, T. and Chase, S., Aqueous processing and fiber spinning of recombinant spider silks. *Macromolecules* **2002**, 35, 1262-1266.
- [261] Brooks, A. E., Stricker, S. M., Joshi, S. B., Kamerzell, T. J., Middaugh, C. R. and Lewis, R. V., Properties of synthetic spider silk fibers based on *Argiope aurantia* MaSp2. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1506-1510.
- [262] Um, I. C., Kweon, H. Y., Lee, K. G., Ihm, D. W., Lee, J. H. and Park, Y. H., Wet spinning of silk polymer - I. Effect of coagulation conditions on the morphological feature of filament. *International journal of biological macromolecules* **2004**, 34, 89-105.
- [263] Lin, Z., Deng, Q., Liu, X. Y. and Yang, D., Engineered large spider eggcase silk protein for strong artificial fibers. *Advanced materials* **2013**, 25, 1216-1220.
- [264] Seidel, A., Liivak, O. and Jelinski, L. W., Artificial spinning of spider silk. *Macromolecules* **1998**, 31, 6733-6736.
- [265] Jones, J. A., Harris, T. I., Tucker, C. L., Berg, K. R., Christy, S. Y., Day, B. A., Gaztambide, D. A., Needham, N. J. C., Ruben, A. L., Oliveira, P. F., Decker, R. E. and Lewis, R. V., More Than Just Fibers: An Aqueous Method for the Production of Innovative Recombinant Spider Silk Protein Materials. *Biomacromolecules* **2015**, 16, 1418-1425.
- [266] Jones, J. A., Harris, T. I., Oliveira, P. F., Bell, B. E., Alhabib, A. and Lewis, R. V., Importance of Heat and Pressure for Solubilization of Recombinant Spider Silk Proteins in Aqueous Solution. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17.

- [267] Humenik, M., Magdeburg, M. and Scheibel, T., Influence of repeat numbers on self-assembly rates of repetitive recombinant spider silk proteins. *Journal of structural biology* **2014**, *186*, 431-437.
- [268] Albertson, A. E., Teule, F., Weber, W., Yarger, J. L. and Lewis, R. V., Effects of different post-spin stretching conditions on the mechanical properties of synthetic spider silk fibers. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **2014**, *29*, 225-234.
- [269] Teule, F., Addison, B., Cooper, A. R., Ayon, J., Henning, R. W., Benmore, C. J., Holland, G. P., Yarger, J. L. and Lewis, R. V., Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers* **2012**, *97*, 418-431.
- [270] van Bemmelen, J. M., L'hydrogel et l'hydrate cristallin de l'oxyde de cuivre. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1894**, *13*, 271-274.
- [271] Ahmed, E. M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research* **2015**, *6*, 105-121.
- [272] Lee, K. Y. and Mooney, D. J., Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews* **2001**, *101*, 1869-1879.
- [273] Kim, S. W., Bae, Y. H. and Okano, T., Hydrogels: swelling, drug loading, and release. *Pharmaceutical research* **1992**, *9*, 283-290.
- [274] Knight, D. P., Nash, L., Hu, X. W., Haffegge, J. and Ho, M. W., In vitro formation by reverse dialysis of collagen gels containing highly oriented arrays of fibrils. *Journal of biomedical materials research* **1998**, *41*, 185-191.
- [275] Murphy, S. V. and Atala, A., 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology* **2014**, *32*, 773-785.
- [276] Kapoor, S. and Kundu, S. C., Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications. *Acta biomaterialia* **2016**, *31*, 17-32.
- [277] Drury, J. L. and Mooney, D. J., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337-4351.
- [278] Kamath, K. R. and Park, K., Biodegradable Hydrogels in Drug-Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1993**, *11*, 59-84.
- [279] Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J. and Kaplan, D. L., Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **2003**, *24*, 401-416.
- [280] Wichterle, O. and Lim, D., Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **1960**, *185*, 117-118.
- [281] Singh, A., Sharma, P. K., Garg, V. K. and Garg, G., Hydrogels: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2010**, *4*, 97-105.
- [282] Hamidi, M., Azadi, A. and Rafiei, P., Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1638-1649.
- [283] Chen, X., Martin, B. D., Neubauer, T. K., Linhardt, R. J., Dordick, J. S. and Rethwisch, D. G., Enzymatic and chemoenzymatic approaches to synthesis of sugar based polymer and hydrogels. *Carbohydrate polymers* **1995**, *28*, 15-21.
- [284] Kashyap, N., Kumar, N. and Kumar, M. N., Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **2005**, *22*, 107-149.
- [285] Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. and Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2000**, *50*, 27-46.

- [286] Shin, H., Jo, S. and Mikos, A. G., Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **2003**, 24, 4353-4364.
- [287] Tibbitt, M. W. and Anseth, K. S., Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* **2009**, 103, 655-663.
- [288] Hubbell, J. A., Biomaterials in Tissue Engineering. *Bio-Technology* **1995**, 13, 565-576.
- [289] Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S. C. and Wang, X., Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, 457-470.
- [290] Teramoto, H., Kameda, T. and Tamada, Y., Preparation of gel film from *Bombyx mori* silk sericin and its characterization as a wound dressing. *Biosci Biotechnol Biochem* **2008**, 72, 3189-3196.
- [291] Ovington, L. G., Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology* **2007**, 25, 33-38.
- [292] Deng, C. M., He, L. Z., Zhao, M., Yang, D. and Liu, Y., Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. *Carbohydrate polymers* **2007**, 69, 583-589.
- [293] Krsko, P., McCann, T. E., Thach, T. T., Laabs, T. L., Geller, H. M. and Libera, M. R., Length-scale mediated adhesion and directed growth of neural cells by surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomaterials* **2009**, 30, 721-729.
- [294] Suntivich, R., Drachuk, I., Calabrese, R., Kaplan, D. L. and Tsukruk, V. V., Inkjet printing of silk nest arrays for cell hosting. *Biomacromolecules* **2014**, 15, 1428-1435.
- [295] Mori, H. and Tsukada, M., New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. *Journal of biotechnology* **2000**, 74, 95-103.
- [296] Chow, D., Nunalee, M. L., Lim, D. W., Simnick, A. J. and Chilkoti, A., Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. *Material Science and Engineering R* **2008**, 62, 125-155.
- [297] Stamatialis, D. F., Papenburg, B. J., Girones, M., Saiful, S., Bettahalli, S. N. M., Schmitmeier, S. and Wessling, M., Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science* **2008**, 308, 1-34.
- [298] Hoffman, A. S., Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, 54, 3-12.
- [299] Chung, H. J. and Park, T. G., Self-assembled and nanostructured hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Nano Today* **2009**, 4, 429-437.
- [300] Berl, V., Huc, I., Khoury, R. G., Krische, M. J. and Lehn, J. M., Interconversion of single and double helices formed from synthetic molecular strands. *Nature* **2000**, 407, 720-723.
- [301] Gazit, E., Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chemical Society reviews* **2007**, 36, 1263-1269.
- [302] Kadirvelu, K. and Fathima, N. N., Self-assembly of keratin peptides: Its implication on the performance of electrospun PVA nanofibers. *Scientific reports* **2016**, 6, 36558.
- [303] Silver, F. H., Freeman, J. W. and Sehra, G. P., Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of biomechanics* **2003**, 36, 1529-1553.
- [304] Slotta, U., Hess, S., Spiess, K., Stromer, T., Serpell, L. and Scheibel, T., Spider silk and amyloid fibrils: A structural comparison. *Macromolecular bioscience* **2007**, 7, 183-188.
- [305] Humenik, M., Smith, A. M. and Scheibel, T., Recombinant spider silks—Biopolymers with potential for future applications. *Polymers* **2011**, 3, 640-661.

- [306] Humenik, M. and Scheibel, T., Self-assembly of nucleic acids, silk and hybrid materials thereof. *Journal of Physics-Condensed Matter* **2014**, 26.
- [307] Humenik, M., Smith, A. M., Arndt, S. and Scheibel, T., Ion and seed dependent fibril assembly of a spidroin core domain. *Journal of structural biology* **2015**, 191, 130-138.
- [308] Nguyen, H. D. and Hall, C. K., Molecular dynamics simulations of spontaneous fibril formation by random-coil peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 16180-16185.
- [309] Nguyen, H. D. and Hall, C. K., Spontaneous fibril formation by polyalanines; discontinuous molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 1890-1901.
- [310] Cohen, S. I. A., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. and Knowles, T. P. J., From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *Journal of molecular biology* **2012**, 421, 160-171.
- [311] Kenney, J. M., Knight, D., Wise, M. J. and Vollrath, F., Amyloidogenic nature of spider silk. *European Journal of Biochemistry* **2002**, 269, 4159-4163.
- [312] Kim, U. J., Park, J., Li, C., Jin, H. J., Valluzzi, R. and Kaplan, D. L., Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 786-792.
- [313] Das, S., Pati, F., Choi, Y. J., Rijal, G., Shim, J. H., Kim, S. W., Ray, A. R., Cho, D. W. and Ghosh, S., Bioprintable, cell-laden silk fibroin-gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. *Acta biomaterialia* **2015**, 11, 233-246.
- [314] Jungst, T., Smolan, W., Schacht, K., Scheibel, T. and Groll, J., Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chemical reviews* **2016**, 116, 1496-1539.
- [315] Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jungst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J., Groll, J. and Huttmacher, D. W., 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced materials* **2013**, 25, 5011-5028.
- [316] Wlodarczyk-Biegun, M. K. and Del Campo, A., 3D bioprinting of structural proteins. *Biomaterials* **2017**, 134, 180-201.
- [317] Fredriksson, C., Hedhammar, M., Feinstein, R., Nordling, K., Kratz, G., Johansson, J., Huss, F. and Rising, A., Tissue Response to Subcutaneously Implanted Recombinant Spider Silk: An in Vivo Study. *Materials* **2009**, 2, 1908-1922.
- [318] Widhe, M., Bysell, H., Nystedt, S., Schenning, I., Malmsten, M., Johansson, J., Rising, A. and Hedhammar, M., Recombinant spider silk as matrices for cell culture. *Biomaterials* **2010**, 31, 9575-9585.
- [319] Moisenovich, M. M., Pustovalova, O. L., Arhipova, A. Y., Vasiljeva, T. V., Sokolova, O. S., Bogush, V. G., Debabov, V. G., Sevastianov, V. I., Kirpichnikov, M. P. and Agapov, I. I., In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2011**, 96A, 125-131.
- [320] Agapov, I. I., Pustovalova, O. L., Moisenovich, M. M., Bogush, V. G., Sokolova, O. S., Sevastyanov, V. I., Debabov, V. G. and Kirpichnikov, M. P., Three-dimensional scaffold made from recombinant spider silk protein for tissue engineering. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **2009**, 426, 127-130.
- [321] Sponner, A., Schlott, B., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F. and Weisshart, K., Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk. *Biochemistry* **2005**, 44, 4727-4736.

- [322] DeSimone, E., Schacht, K. and Scheibel, T., Cations influence the cross-linking of hydrogels made of recombinant, polyanionic spider silk proteins. *Materials Letters* **2016**, *183*, 101-104.
- [323] Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H. and Cameron, D. G., Fourier Self-Deconvolution - a Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands. *Applied Spectroscopy* **1981**, *35*, 271-276.
- [324] Kumar, S. and Nussinov, R., Close-range electrostatic interactions in proteins. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2002**, *3*, 604-617.
- [325] Brooks, A. E., Nelson, S. R., Jones, J. A., Koenig, C., Hinman, M., Stricker, S. and Lewis, R. V., Distinct contributions of model MaSp1 and MaSp2 like peptides to the mechanical properties of synthetic major ampullate silk fibers as revealed in silico. *Nanotechnology, science and applications* **2008**, *1*, 9-16.
- [326] Madurga, R., Blackledge, T. A., Perea, B., Plaza, G. R., Riek, C., Burghammer, M., Elices, M., Guinea, G. and Perez-Rigueiro, J., Persistence and variation in microstructural design during the evolution of spider silk. *Scientific reports* **2015**, *5*, 14820.
- [327] Hu, X., Lu, Q., Sun, L., Cebe, P., Wang, X., Zhang, X. and Kaplan, D. L., Biomaterials from ultrasonication-induced silk fibroin-hyaluronic acid hydrogels. *Biomacromolecules* **2010**.
- [328] Thamm, C., DeSimone, E. and Scheibel, T., Characterization of Hydrogels Made of a Novel Spider Silk Protein eMaSp1s and Evaluation for 3D Printing. *Macromolecular bioscience* **2017**.
- [329] Humenik, M., Drechsler, M. and Scheibel, T., Controlled hierarchical assembly of spider silk-DNA chimeras into ribbons and raft-like morphologies. *Nano letters* **2014**, *14*, 3999-4004.
- [330] Yucel, T., Lovett, M. L. and Kaplan, D. L., Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, *190*, 381-397.

4. PUBLIKATIONSLISTE

- I. **Thamm, C.** and Scheibel, T. (2017) Recombinant production, characterization, and fiber spinning of an engineered short ampullate spidroin (MaSp1s). *Biomacromolecules* 18(4): 1365-1372.
- II. **Thamm, C.**, DeSimone, E. and Scheibel, T. (2017) Characterization of hydrogels made of a novel spider silk protein eMaSp1s and evaluation for 3D printing. *Macromolecular Bioscience*. In print.
- III. Wohlrab, S., **Thamm, C.** and Scheibel, T. (2013) The Power of Recombinant Spider Silk Proteins. In: Asakura, Miller: Biotechnology of Silk, *Springer*, pp. 179-201.
- IV. Eisoldt, L., **Thamm, C.** and Scheibel, T. (2012) The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers* 97(6): 355-361.
- V. Hagn, F., **Thamm, C.**, Scheibel, T. and Kessler, H. (2010) pH-Dependent Dimerization and Salt-Dependent Stabilization of the N-terminal Domain of Spider Dragline Silk - Implications for Fiber Formation. *Angewandte Chemie International Edition* 50(1): 310-313.

5. DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS

Im Laufe der vorliegenden Dissertation entstanden vier Publikationen, die zum Teil in Zusammenarbeit mit anderen Personen entstanden. Im Folgenden werden die einzelnen Beiträge der beteiligten Autoren zu jeder einzelnen der vier Veröffentlichungen dargestellt.

- I. **Thamm, C.** and Scheibel, T. (2017) Recombinant production, characterization, and fiber spinning of an engineered short ampullate spidroin (MaSp1s). *Biomacromolecules* 18(4): 1365-1372.

Das Konzept der Studie wurde von mir und Thomas Scheibel entworfen. Alle benötigten rekombinanten Proteine wurden von mir hergestellt, gereinigt, analysiert und verarbeitet. Alle Spinnversuche und die nachfolgenden mechanischen und strukturellen Analysen der Fasern wurden von mir durchgeführt. Thomas Scheibel war jederzeit in die wissenschaftliche Diskussion eingebunden. Das Manuskript wurde von mir angefertigt und in Zusammenarbeit mit Thomas Scheibel fertig gestellt.

- II. **Thamm, C.,** DeSimone, E. and Scheibel, T. (2017) Characterization of hydrogels made of a novel spider silk protein eMaSp1s and evaluation for 3D printing. *Macromolecular Bioscience*. In print.

Das Konzept der Studie wurde von mir und Thomas Scheibel entworfen. Alle benötigten rekombinanten Proteine wurden von mir hergestellt, gereinigt und verarbeitet. Die REM Aufnahmen wurden zusammen mit Hendrik Bargel, die TEM Aufnahmen mit Tamara Aigner und die AFM Aufnahmen mit Martin Humenik durchgeführt. Die rheologischen Messungen zur mechanischen Regeneration der Hydrogele wurden zusammen mit Elise DeSimone entwickelt. Alle anderen Experimente und Analysen wurden von mir durchgeführt. Nach wissenschaftlicher Diskussion mit allen Autoren wurde das Manuskript von mir und Elise DeSimone angefertigt und in Zusammenarbeit mit Thomas Scheibel fertig gestellt.

- III. Wohlrab, S., **Thamm, C.** and Scheibel, T. (2013) The Power of Recombinant Spider Silk Proteins. In: Asakura, Miller: Biotechnology of Silk, *Springer*, pp. 179-201.

Die Konzeption des Artikels wurde von Stefanie Wohlrab, Thomas Scheibel und mir entworfen. Das Manuskript inklusive der dazugehörigen Abbildungen wurde von Stefanie Wohlrab und mir angefertigt und in Zusammenarbeit mit Thomas Scheibel fertig gestellt.

- IV. Eisoldt, L., **Thamm, C.** and Scheibel, T. (2012) The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers* 97(6): 355-361.

Die Konzeption des Artikels wurde von Thomas Scheibel und Lukas Eisoldt entworfen. Die Abbildungen wurden von mir erstellt. Das Manuskript wurde von Lukas Eisoldt angefertigt und in Zusammenarbeit mit mir und Thomas Scheibel fertig gestellt

6. TEILARBEITEN

6.1. TEILARBEIT I

Recombinant production, characterization, and fiber spinning of an engineered short ampullate spidroin (MaSp1s)

Thamm, C. and Scheibel, T.

Veröffentlicht in *Biomacromolecules* 18(4): 1365-1372.

2017

Abdruck mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Recombinant Production, Characterization, and Fiber Spinning of an Engineered Short Major Ampullate Spidroin (MaSp1s)

Christopher Thamm[†] and Thomas Scheibel^{*,†,‡,§,||,⊥,#}

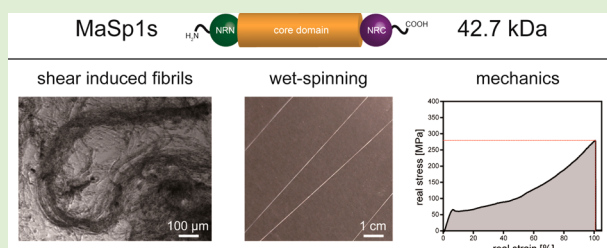
[†]Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften and [‡]Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[§]Bayerisches Polymerinstitut (BPI), Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

^{||}Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), [⊥]Institut für Bio-Makromoleküle (bio-mac), and [#]Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

S Supporting Information

ABSTRACT: Spider dragline silk exhibits an extraordinary toughness and is typically composed of two types of major ampullate spidroins (MaSp1 and MaSp2), differing in their proline content and hydrophobicity. In this paper, we recombinantly produced an unusual but naturally occurring short major ampullate spidroin (MaSp1s) as a fusion construct between established *Latrodectus hesperus* terminal domains and the novel *Cyrtophora moluccensis* core domain. The sequence of the recombinant spidroin was engineered to guarantee high yields upon recombinant production and was named eMaSp1s. Its solution structure as well as the mechanical properties of wet-spun eMaSp1s fibers were examined. Structural characterization using CD- and FTIR spectroscopy showed a predominantly α -helical solution structure and a high β -sheet content within fibers. Surprisingly, eMaSp1s fibers show similar mechanical properties as wet-spun fibers of other engineered spider silk proteins, albeit eMaSp1s has a lower molecular weight and not the typical sequence repeats in its core domain. Therefore, the findings provide insights into the molecular interplay necessary to obtain the typical silk fiber mechanics.



INTRODUCTION

Females of weaving spiders such as *Cyrtophora moluccensis* (orb-weaver) or *Latrodectus hesperus* (cob-weaver) are able to produce up to seven different types of silk,¹ among which the major ampullate (MA) silk (dragline silk) is the best investigated type. MA silk combines good tensile strength and extensibility, leading to a high toughness exceeding that of most natural or synthetic fibers.^{2–6} The underlying proteins, called spidroins, originate from the major ampullate gland and comprise two classes, major ampullate spidroin 1 and 2 (MaSp1, MaSp2).^{7–9} MaSp have on average a molecular weight of 250–350 kDa, and both classes can be distinguished by their proline content.^{10,11} While MaSp1 is more hydrophobic and poor in proline residues, MaSp2 is more hydrophilic and proline-rich.^{11–13} Interestingly, the ratio of MaSp1 and MaSp2 greatly differs between spider species, and a putative impact on fiber mechanics has been previously considered.^{10,14}

All known MA spidroins share the same architecture with a repetitive intrinsically unstructured core domain (90% of the protein's sequence with up to 100 repeats of highly conserved sequence motifs, each comprising 40–200 amino acids) flanked by folded (five helix bundles), nonrepetitive amino- (NRN) and carboxy-terminal (NRC) domains (100–150 amino acids).^{7,15,16} The sequence motifs of the repetitive domains include polyalanine stretches (typically 4–9 alanines) forming β -sheets upon fiber assembly providing the basis for their

identified high tensile strength,¹⁷ and glycine-rich areas ((GGX)_n GPGXX), X = Y, L, or Q) generating an amorphous matrix, thus being responsible for the elasticity of the spider silk fiber.^{18–20} While polyaniline and GGX are ubiquitous, GPGXX is only present in MaSp2.^{8,21} In contrast to the repetitive domain whose sequence varies between different spider species, the terminal domains of spider silk proteins are highly conserved.^{7,22–24} Both terminal domains show α -helical secondary structure and are important for controlling spidroin storage as well as fiber assembly with slightly different features and functions.^{24–28}

Recently, Han et al. discovered a novel MaSp1 protein in *Cyrtophora moluccensis*, differing from all previously identified MaSp.²⁹ The full length protein contains only a small core region flanked by the typical, conserved terminal domains and is comprised of 439 amino acids in total. Strikingly, the core domain lacks the usual repetitive character and also the typical sequence motifs. Because of its low molecular weight, the newly identified protein has been called MaSp1s (MaSp1 short).²⁹

In order to analyze the features of this novel type of major ampullate spidroins, MaSp1s was genetically engineered for recombinant production in *E. coli*. The gained eMaSp1s was

Received: January 19, 2017

Revised: February 20, 2017

Published: February 24, 2017

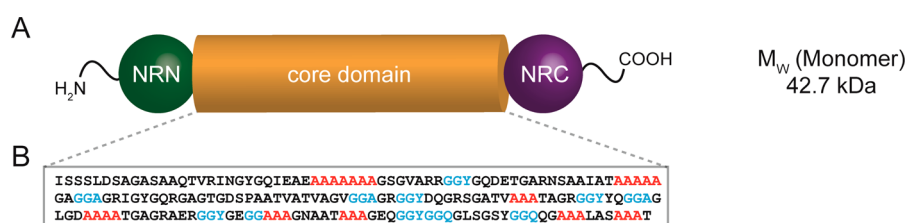


Figure 1. Schematic structure and core sequence of MaSp1s. (A) MaSp1s consists of a 191 aa long core domain flanked by a nonrepetitive amino-terminal (NRN) and carboxy-terminal (NRC) domain. The theoretical molecular weight (MW, calculated using the ProtParam tool: <http://web.expasy.org/protparam>) is 42.7 kDa. (B) Sequence of the eMaSp1s core domain. MaSp1 specific sequence motifs are highlighted in red (poly-A) and blue (GGX). One unusual feature is the absence of the typically occurring repeats of sequence motifs. Another feature is the high content of charged amino acid residues (10.5%).

characterized concerning its secondary structure in solution as well as its thermal and chemical stability. Fibers were produced using wet-spinning, showing the versatility of this protein for the production of fibrous morphologies. Their mechanical data were compared to that of natural spider silk fibers and other wet-spun spider silk fibers, providing further insights into the basis of spider silk's mechanics.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals used in this study had analytical grade purity and were acquired from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlruhe, Germany). Double-distilled water was prepared using a Millipore system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Protein Production and Purification. Synthetic genes encoding the MaSp1s core domain and the terminal domains of *L. hesperus* NRN1 and NRC1 were obtained from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). Cloning of the eMaSp1s (engineered MaSp1s) full length construct (NRN1, MaSp1s core domain, NRC1, 42.7 kDa) was performed using the pCS-system as previously described.¹² For gene expression, the construct was cloned into a pET-Vector containing a SUMO-TAG,^{30,31} and the resulting vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3)-gold (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany). Gene expression was induced at OD₆₀₀ = 50 using 0.1 mM IPTG followed by further 3 h of fermentation in a Minifors reactor (Infors HT, Bottmingen, Switzerland) at 30 °C in LB Medium containing 35 µg mL⁻¹ kanamycin and 0.001% (v/v) Breox FMT 30 antifoam (Cognis, BASF, Ludwigshafen, Germany). Resulting cell pellets were disrupted using a high-pressure homogenizer (HDH Niro Soavi Panda 2K, Gea Niro Soavi, Parma, Italy) followed by centrifugation and addition of 10 mM imidazole to the supernatant. Protein purification was performed using an ÄKTA FPLC system (GE Healthcare, Germany). The supernatant was loaded onto a Ni-NTA sepharose column (120 mL, GE Healthcare, Germany) and washed with 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.5 (buffer A) until the baseline was reached. A washing step with 30 mM imidazole (6% buffer B) before elution with 60% buffer B (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.5) increased the purity of the protein. The eluate was mixed with 1:500 (v/v) SUMO-Protease (7 mg mL⁻¹) to cleave off the SUMO-TAG within 1 h at 20 °C and afterward eMaSp1s was precipitated using 20% ammonium sulfate at 4 °C for 1 h. After centrifugation, the resulting pellet was washed with water, dissolved in 6 M guanidinium thiocyanate, dialyzed against 25 mM NH₄HCO₃, and lyophilized.

N1L(AQ)₁₂NR₃ was used as a well-described spider silk protein control and produced using the SUMO-system^{30,31} and purified using nickel affinity chromatography, followed by cleavage of the SUMO-TAG and ammonium sulfate precipitation as described previously.^{12,27} N1L(AQ)₁₂NR₃ consists of 12 repetitive consensus modules, containing spider silk typical (MaSp2-type) polyaniline stretches (A) and glycine/proline-rich areas, flanked by N- and C-terminal domains (Figure S1).

Circular Dichroism (CD) and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR). CD measurements were performed using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt, Germany). For

near-UV (70 µM protein concentration) and far-UV CD measurements (5 µM protein concentration), 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, and cuvettes with a path length of 0.5 cm (near-UV) and 0.1 cm (far-UV) were used, respectively. Thermal transitions (5 µM protein concentration) were measured at 222 nm and a heating rate of 1 °C min⁻¹. Chemical unfolding (5 µM protein concentration) was analyzed in the presence of increasing amounts of urea until a concentration of 7.5 M was reached. Samples were incubated for 5 h at 4 °C and analyzed at 222 nm.

FTIR measurements were recorded in absorbance mode using a Bruker Tensor 27 IR spectrometer (Bruker, Germany). Lyophilized samples were placed on an ATR-crystal and pressed with a stamp. Fibrous samples were measured with the attached hyperion 1000 microscope unit. Each measurement comprised a 60-scan interferogram with a 2 cm⁻¹ resolution between 4000 and 800 cm⁻¹. The amide I region (1590–1720 cm⁻¹) was analyzed by Fourier self-deconvolution (FSD) using OPUS software (version 6.5). Signals were assigned to protein secondary structure elements according to Hu et al.³²

Shear-Induced Fiber Assembly. The protein was directly solved in buffer containing 20 mM potassium phosphate, pH 7.5, and the final concentration was adjusted to 23.4 µM eMaSp1s. Samples were incubated for 16 h at 25 °C in 2 mL reaction tubes with overhead rotation at 21 rpm (Intellimixer RM-2, NeoLab, Germany). After rotation, clearly visible fibrous protein structures were analyzed on glass slides by optical microscopy using a Leica Microscope DMI 3000B.

Spinning Dope Preparation and Wet-Spinning. eMaSp1s and N1L(AQ)₁₂NR₃ were wet-spun according to the protocol of Heidebrecht et al.²⁷ Blend fibers were spun using self-assembled, phase-separated (biomimetic) spinning dope. To generate a biomimetic spinning dope (BSD), both proteins were dissolved in 6 M GdmSCN and dialyzed separately against 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl buffer, which initiated refolding of the α-helical terminal domains, and mixed at a molar ratio of 1:1, followed by dialysis against 40 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2.

MaSp1s fibers were spun using a classical spinning dope because it did not phase-separate in the absence of N1L(AQ)₁₂NR₃. For preparation of a classical spinning dope (CSD), MaSp1s was dissolved in 6 M GdmSCN and dialyzed against 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, followed by dialysis against 20% (w/v) PEG (35 kDa) solution up to a final spinning dope protein concentration of 10–12% (w/v).

The spinning dopes were extruded into an isopropanol/water coagulation bath at a speed of 5–7 µL min⁻¹. Poststretching was performed manually in isopropanol.

Fiber Analysis. Fiber morphology and fiber diameters were analyzed using an optical microscope (Leica DMI3000B) and the software Leica V4.3. SEM pictures of platinum sputtered samples (2 nm platinum coating) were taken using a Zeiss 1540 EsB CrossBeam (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Tensile Testing. For tensile testing, 1 cm long fibers were fixed on plastic sample holders with a 2 mm gap using superglue (UHU GmbH & Co. KG). Tensile testing was performed using a BOSE Electroforce 3220 with a 0.49 N load cell and a pulling rate of 0.04 mm s⁻¹ at 20 °C

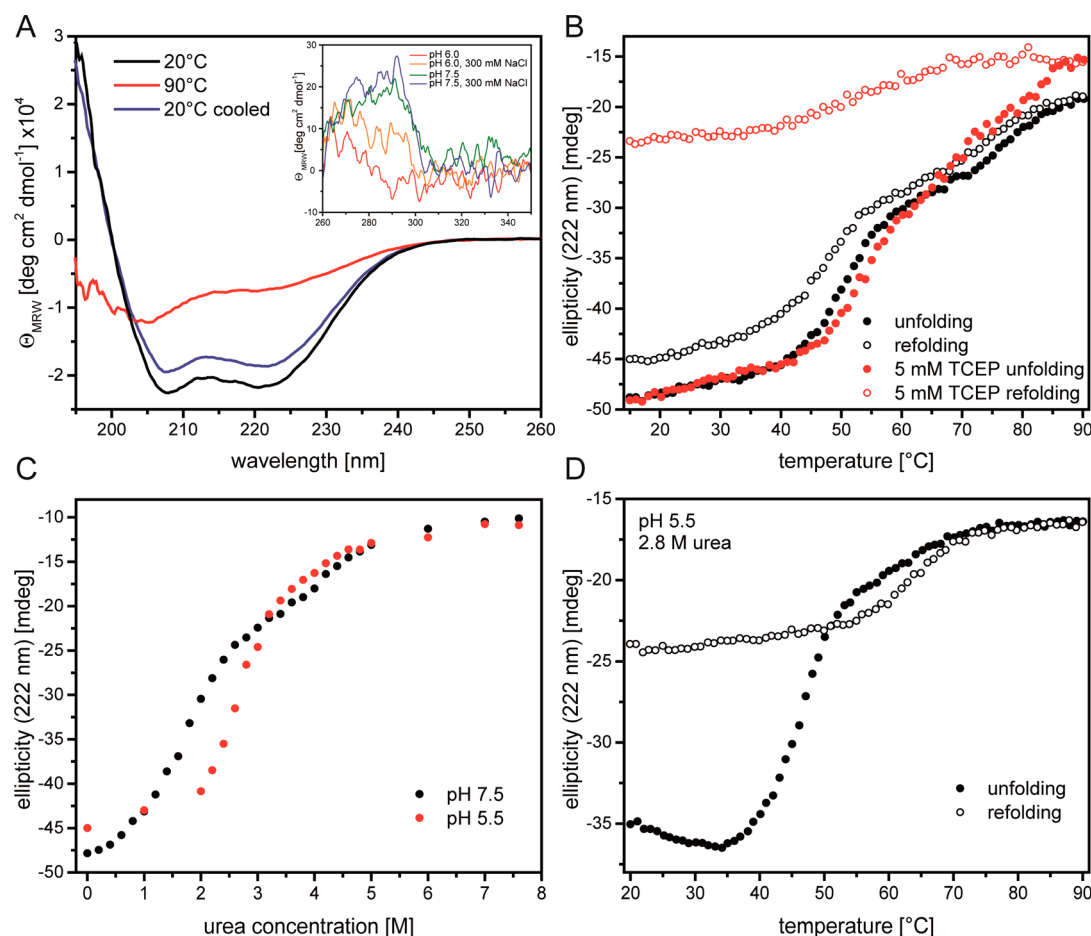


Figure 2. Structural characterization and thermal and chemical stability of eMaSp1s. (A) Far-UV spectra of eMaSp1s show mainly α -helical structure in solution. The inset shows the detected differences in near-UV spectra of eMaSp1s at pH 6.0 and pH 7.5 in the absence and presence of 300 mM NaCl. The far-UV spectra are indistinguishable at different pH values. (B) Thermal stability of eMaSp1s and influence of TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) as a reducing agent on thermal stability. (C) Urea-induced unfolding of eMaSp1s at pH 7.5 and pH 5.5. (D) Thermal stability of eMaSp1s at pH 5.5 in the presence of 2.8 M urea.

and 30% relative humidity (Bose Co., Framingham, MA). The cross-sectional area was calculated upon measuring the microfiber diameter at 5–10 different positions using optical microscopy. Mechanical data were calculated considering true stress and true strain using Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Sample numbers were ≥ 15 except for unstretched eMaSp1s fibers spun from CSD ($n = 6$).

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning, Production, and Purification of eMaSp1s.

The sequence of a novel type of major ampullate spidroin, MaSp1s, comprises of 439 amino acids (aa) with a core domain (192 aa) flanked by spider silk-typical amino- (149 aa) and carboxy-terminal (98 aa) domains (Figure 1A).²⁹ The novel spidroin was attributed to the class of MaSp1 proteins, because MaSp1 characteristic motifs, such as GGX and polyalanine, and no proline residues were present (Figure 1B).⁸ However, the identified sequence differed significantly from that of other major ampullate spidroins, because the detected polyalanine stretches were rather short and inhomogeneously distributed, and likewise GGX-motifs were sparsely found. The most striking difference to all preliminary known spidroins is its small, nonrepetitive core and the relatively large number of charged amino acid residues. In contrast, in comparison with terminal domains of various other spider silk proteins those of

MaSp1s are highly conserved (Figure S2 in Supporting Information). To analyze the features of the MaSp1s core domain in comparison to those of “classical” ones, it was fused to the well-established and characterized terminal domains of *L. hesperus* MaSp1 (NRN1 and NRC1).^{7,24,28}

After successful cloning, eMaSp1s was produced using the SUMO system, containing a polyhistidine affinity tag.³⁰ Highest yield and purity were achieved upon affinity chromatography, followed by SUMO-TAG cleavage, ammonium sulfate precipitation, and freeze drying. Final protein yield for MaSp1s after purification was in a range of 300–400 mg per liter of induced culture medium. For further experiments, the lyophilized protein was redissolved directly in aqueous buffers up to a concentration of 2% (w/v). The excellent solubility of the lyophilized protein in aqueous buffers was very likely due to its high amount of charged amino acid residues. Less charged MaSp derivatives often show lower yields in the range of 4–150 mg per liter³³ and have to be dissolved in strong denaturants (e.g., GdmSCN) after lyophilization and then dialyzed against aqueous buffers.^{12,27}

Structural Characterization of eMaSp1s. eMaSp1s was structurally examined in solution using CD spectroscopy, and further its thermal and chemical stability was analyzed. Recent studies showed α -helical structure of terminal spider silk domains, whereas the core domains of spider silk proteins were

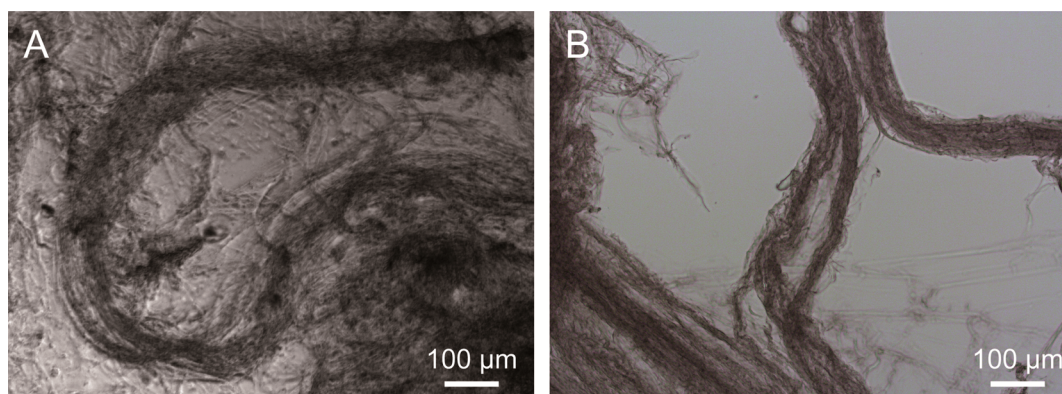


Figure 3. MaSp1s and N1L(AQ)₁₂NR3 fiber morphologies upon shear-induced assembly. Light microscopy of (A) eMaSp1s and (B) N1L(AQ)₁₂NR3 fibers assembled by rotation.

predicted to be mainly unfolded in solution.³⁴ In aqueous solution, eMaSp1s exists as a dimer, based on the fact that the C-terminal domain builds a permanent parallel-oriented dimer, covalently linked by a disulfide bond. eMaSp1s spectra showed local minima at 208 and 222 nm, indicative of mainly α -helical structures as expected for the terminal domains. At 90 °C, the protein was unfolded but it could refold almost completely upon cooling (Figure 2A).

Temperature-induced unfolding of eMaSp1s revealed a 2-step transition with melting temperatures (T_m) at 47 and 72 °C (Figure 2B), perfectly matching the melting points of the individual N- and C-terminal domains.^{24,26} Refolding also occurred in a two-step process in the presence of reducing agents like TCEP during temperature-induced unfolding. A strong tendency of protein aggregation could be detected during refolding under reducing conditions due to destabilization of the C-terminal domain upon reducing its disulfide bond (Figure 2B).

Features of the near-UV CD spectra of eMaSp1s were similar to that of the isolated N-terminal domain (Figure 2A insert).²⁴ Significant differences could be observed for spectra at pH 7.5 (condition in the gland) and pH 6.0 (condition in the spinning duct) with a stronger influence of salt at pH 6.0 indicating a pH-dependent conformational switch as observed previously for the N-terminal domain. Taken together, the eMaSp1s solution structure is apparently dominated by the folded terminal domains with little structural impact of the core domain.

The chemical stability of eMaSp1s was tested in the presence of urea, revealing again a 2-step transition upon rising urea concentrations based on successive unfolding of both terminal domains (Figure 2C). In eMaSp1s, the N-terminal domain unfolds at urea concentrations of about 1.9 M, while the C-terminal domain unfolds at a concentration of about 3.6 M. Between these values at the transition point at 2.8 M urea, the N-terminal domain is unfolded but the C-terminal domain is still folded.

During natural fiber assembly, the pH value drops from pH 7.2 to pH 5.7,^{35,36} however NRN is already a stable dimer at pH 6.0.^{28,37} Chemical unfolding experiments of eMaSp1s at pH 5.5 clearly indicated a higher structural stability of NRN at lower pH values (Figure 2C). This is in accordance with previous results showing that the NRN domains form antiparallel homodimers at a slightly acidic pH value that stabilizes the structure.^{24,38,39}

Temperature-induced unfolding of eMaSp1s at the chemical transition point of 2.8 M urea and at pH 5.5 showed a similar unfolding behavior as seen in the absence of urea but refolding led to aggregation of the protein due to destabilization of intermolecular salt bridges within the C-terminal domain at this pH (Figure 2D).²⁶

Effect of Shear Forces on eMaSp1s Assembly. Shear stress is one of the main triggering factors of silk fiber assembly, which is accompanied by an increase in β -sheet structure of the underlying proteins.^{40–44}

Surprisingly, despite the high solubility of eMaSp1s in aqueous buffers at pH 7.5, which is negatively charged at these conditions, exposing a solution of recombinantly produced eMaSp1s to shear forces lead to clearly visible fibrils within the reaction tube after 16 h (Figure 3A). Such behavior was previously reported for other engineered spider silk proteins containing NRC domains (Figure 3B), while spidroins without NRC domains aggregated unspecifically.^{40,45,46} Another previously described miniature spider silk protein derived from *Euprosthenops australis* (4RepCT) showed the same behavior.^{25,46,47} In contrast to eMaSp1s with its novel nonrepetitive core domain, this 23.4 kDa protein consists of four repetitive modules containing polyalanine and glycine-rich stretches with two positive charges (Arg) and the conserved C-terminal domain of *Nephila clavipes*. The 4RepCT protein was merely spun into fibers by gently tilting a protein solution in glass tubes.⁴⁶

Control fibers are shown exemplarily of the previously established N1L(AQ)₁₂NR3, a 76 kDa MaSp2 protein consisting of 12 repetitive consensus sequence modules of the core domain of *Araneus diadematus* fibroin 3 (ADF3), containing polyalanine stretches (A) and glycine/proline-rich areas (Q) but no charged amino acid residues and flanked by a respective N- and C-terminal domain (Figure 3B).²⁷ Rotation-induced self-assembled N1L(AQ)₁₂NR3 fibers had a diameter of 5–10 μ m.

The diameter of individual rotation-induced self-assembled eMaSp1s fibers were slightly below 10 μ m. It was not possible to determine their mechanical properties due to the instability of the fibers after the removal from the solution and the impossibility to isolate single fibers out of the resulting fiber bundles. Therefore, those fibers were not further investigated in this project, and another technique to produce fibers was evaluated.

Wet-Spinning. A large variety of artificial MaSp1 and MaSp2 proteins with differing molecular weight have been

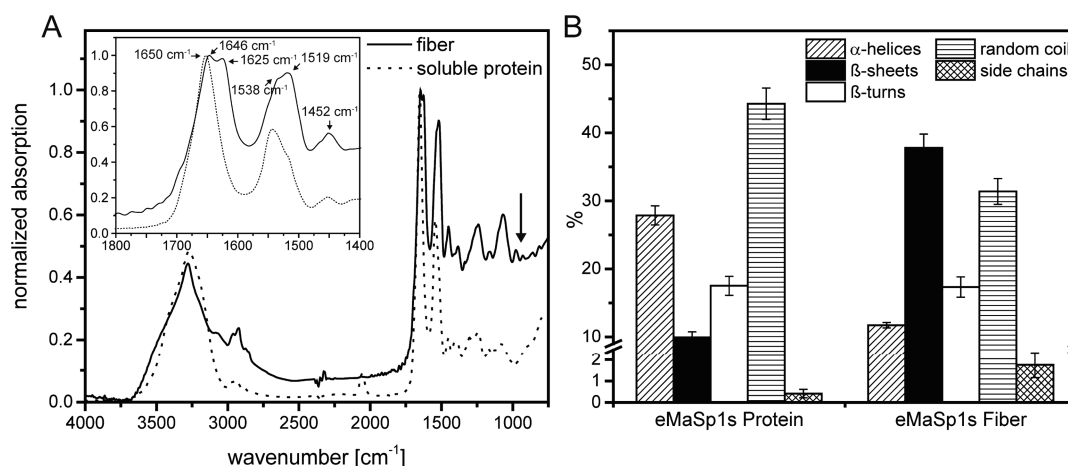


Figure 4. (A) Fourier-transformed infrared spectra of soluble eMaSp1s and eMaSp1s fibers. The inset shows the amide I and II regions between 1800 and 1400 cm^{-1} in more detail. (B) Secondary structure distribution of eMaSp1s in solution and eMaSp1s fibers. Spectra were deconvoluted using Fourier self-deconvolution (FSD) of the amide I band.⁵²

produced using wet-spinning methods, and the challenge has been so far to obtain fibers with mechanical properties comparable to that of natural spider silk fibers.^{27,33}

All proteins in this study contained the folded amino- and carboxy-terminal domains, shown to be important for spider silk assembly properties.²⁷ The N-terminal domain is monomeric under neutral pH conditions, likely inhibiting protein aggregation within the spinning dope. The C-terminal domain is a stable disulfide-bridged dimer, crucial for protein assembly into micellar structures within the spinning dope. Furthermore, both domains seem to be important for initiating fiber assembly upon external stimuli such as pH-drop and shear-forces.

The preparation of spinning dopes followed two routes: a classical one by simply concentrating spidroin solutions and a more recent one depending on self-assembly of the spidroins prior to spinning (yielding a so-called biomimetic spinning dope). In the biomimetic spinning dope, a phase separation is caused by a conformational change of the NRC-domain, effecting the spidroins to assemble into micelle-like structures.⁴⁸

Interestingly, eMaSp1s showed no phase separation probably due to the sequence (short length, changed amino acids) of the core domain. According to the current model, the core domain is packed inside the spidroin micelles (existing in the spinning dope), while the terminal domains reside on their surface. The underlying driving force is based on the more hydrophobic character of the core domain in combination with its larger proportion in comparison to the terminal domains. The short length in combination with the solubility (hydrophobicity index: -0.1) of the eMaSp1s core domain probably does not support this molecular feature.

Therefore, eMaSp1s was spun from classical spinning dope. Wet-spinning of soluble eMaSp1s (15% (w/v)) out of an aqueous buffer solution into isopropanol/water mixture was successful, and fibers could be poststretched in isopropanol up to 400% (Figure 5A insert).

In addition, eMaSp1s could be blended with N1L(AQ)₁₂NR3, which can phase separate,²⁷ at a molar ratio of 1:1. Phase separation of this blend was possible and yielded the above-mentioned biomimetic spinning dope. Interestingly, under these conditions eMaSp1s could be implemented into the micelles (Figure 6) and in the fibers spun thereof, as seen by gel electrophoresis (Figure S3). As-spun blend fibers could

be poststretched up to at least 600% (Figure 5B insert) similar to fibers made solely of N1L(AQ)₁₂NR3.

Structural Properties of eMaSp1s Fibers. Upon spidroin assembly, a conformational transition of the core domain of the underlying proteins occurs: intrinsically unstructured regions fold into β -sheets, which are responsible for the strength of the fibers.^{17,49} In case of eMaSp1s, the FTIR-absorbance maximum of soluble protein at 1650 cm^{-1} (α -helical structure) shifted to an IR-absorbance maximum at 1625 cm^{-1} in eMaSp1s fibers, characteristic for β -sheet structures (Figure 4A). Accordingly, the signal at 1519 cm^{-1} was significantly enhanced, reflecting a further indication for the formation of β -sheets. However, because eMaSp1s does not contain the typical polyaniline stretches of MaSp, which are normally responsible for β -sheet formation, the β -sheets were likely based on the less “perfect” alanine-rich sequences, as identified in a secondary structure prediction analysis of the eMaSp1s core domain, based on the method of Chou and Fasman (Figure S4).⁵⁰ Structure prediction models are based on soluble proteins in which alanine-rich sequences predominantly form α -helices, while they convert into β -sheet structures in silk proteins upon assembly.

Because the polyaniline stretches of eMaSp1s are, unlike in other spidroins, imperfect, no specific polyaniline stacking and related IR-peak for β -ala at 963 cm^{-1} could be detected (arrow in Figure 4A).⁵¹

The overall secondary structure content was calculated using FSD analysis (Figure 4B), confirming an increase of the β -sheet content from 10% in solution to 38% in fibers. The α -helical content decreased from 28% to 12%, and the random coil content from 44% to 31%.

Mechanical Properties of eMaSp1s and eMaSp1s/N1L(AQ)₁₂NR3 Blend Fibers. Stress-strain curves were analyzed of eMaSp1s and N1L(AQ)₁₂NR3 fibers spun from classical spinning dopes (CSD) and eMaSp1s/N1L(AQ)₁₂NR3 blend fibers (ratio 1:1) spun from prestructured biomimetic dopes (BSD) and compared to that of natural spider silk fibers.

eMaSp1s fibers (CSD) could be poststretched up to 400% (average diameter after poststretching: $49 \pm 7 \mu\text{m}$), whereas N1L(AQ)₁₂NR3 fibers (CSD) could be stretched up to at least 600% (average diameter after poststretching: $39 \pm 9 \mu\text{m}$). Surprisingly, mechanical properties of as-spun and post-stretched eMaSp1s fibers were slightly better than that of

Table 1. Mechanical Properties of Natural and Different As-Spun and Post-Stretched Recombinant Spider Silk Fibers Spun from Classical Spinning Dopes and Biomimetic Spinning Dopes^a

	classical spinning dope				
	N1L(AQ) ₁₂ NR3		eMaSp1s		
	0	600	0	400	
poststretching [%]					
diameter [μm]	75 ± 12	39 ± 9	77 ± 7	49 ± 7	
extensibility [%]	4 ± 2	109 ± 23	4 ± 1	102 ± 24	
strength [MPa]	25 ± 14	206 ± 68	31 ± 7	282 ± 66	
toughness [MJm ⁻³]	0.8 ± 0.4	116 ± 46	0.9 ± 0.2	144 ± 44	
Young's modulus [GPa]	0.3 ± 0.2	1.3 ± 0.7	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.3	
biomimetic spinning dope					
	N1L(AQ) ₁₂ NR3		MaSp1s/N1L(AQ) ₁₂ NR3 blend		natural dragline silk ²⁷
	0	600	0	600	
poststretching [%]					
diameter [μm]	155 ± 8	27 ± 10	66 ± 17	36 ± 9	4 ± 0.4
extensibility [%]	6 ± 1	110 ± 25	8 ± 2	93 ± 18	24 ± 8
strength [MPa]	13 ± 2	370 ± 59	23 ± 9	316 ± 103	1183 ± 334
toughness [MJm ⁻³]	0.3 ± 0.1	189 ± 33	0.8 ± 0.1	142 ± 50	167 ± 65
young's modulus [GPa]	0.5 ± 0.1	4 ± 1	0.8 ± 0.2	1 ± 0.4	8 ± 2

^aTensile testing was performed at 20°C and 30% RH. Sample numbers were ≥15 except for unstretched eMaSp1s fibers spun from CSD (*n* = 6).

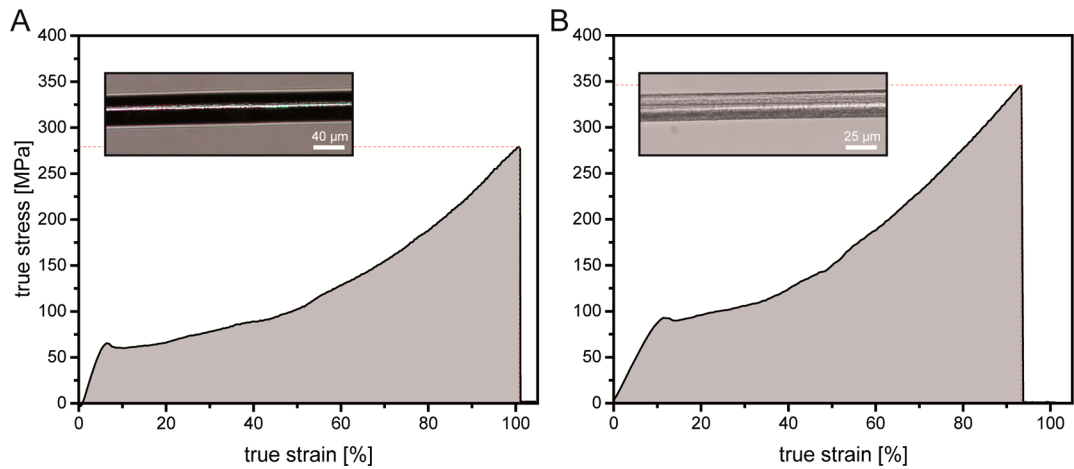


Figure 5. (A) True stress–strain curve of a 400% poststretched eMaSp1s fiber (CSD) (inset: light microscopy image). (B) True stress strain curve of a 600% post stretched wet-spun fiber (inset: light microscopy image) composed of a blend of eMaSp1s and N1L(AQ)₁₂NR3 at a 1:1 ratio (BSD).

N1L(AQ)₁₂NR3 fibers spun from classical spinning dopes. While showing the same extensibility (102 ± 24%), eMaSp1s fibers showed a slightly higher stiffness and higher strength (282 ± 66 MPa), resulting in a slightly but significantly higher overall toughness (144 ± 44 MJm⁻³) (Table 1A, Figure 5A). The slightly better mechanics of eMaSp1s fibers in comparison to that of N1L(AQ)₁₂NR3 fibers are most likely based on a higher overall alanine content (29% vs 16%) and the presence of 22 (11.5%) charged amino acids (resulting in ionic interactions, generally exceeding the strength of covalent ones)^{53,54} in its core domain, while N1L(AQ)₁₂NR3 lacks charges.

Taken together, mechanical properties of fibers were high, regardless of which core was used. Former studies revealed mechanical properties of spider silk fibers to be dependent on the molecular weight and amino acid sequence composition of the underlying protein core domain.^{6,8,55,56}

Despite the different molecular setup of the core domains of eMaSp1s and N1L(AQ)₁₂NR3 (in terms of molecular weight, charges, and amino acid composition), our results show that the influence of the controlling terminal domains is of particular importance for fiber assembly at aqueous conditions.

In terms of extensibility, strength, and toughness, blend fibers were slightly inferior to those made of plain N1L(AQ)₁₂NR3 (Table 1B, Figure 5B), being in line with former results of MaSp1/MaSp2 blend fibers.⁵⁶ Integration of eMaSp1s seems to interfere with N1L(AQ)₁₂NR3 assembly, intercalating in its structure and thereby preventing a perfect intramolecular alignment of the (AQ)₁₂ core domain during fiber assembly.

CONCLUSION

eMaSp1s has been successfully engineered and recombinantly produced in *E. coli*. Circular dichroism analysis of the protein revealed the dominance of its helically folded terminal domains in solution, whereas eMaSp1s fibers showed an increased β -sheet content as shown by FTIR spectroscopy.

Previous studies investigating the mechanical properties of wet-spun fibers made from different recombinantly produced spider silk proteins containing none, only one, or both terminal domains based on sequences of *Araneus diadematus* fibroin 3 (ADF3), named eADF3 (AQ)_{*n*} underline the significant effect of both terminal domains on fiber assembly and resulting mechanical properties.

Here, we varied the protein core domain, replacing the eADF3 (AQ)_n core domain by the novel 17 kDa MaSp1s core domain. Figure 6 outlines the most probable morphological

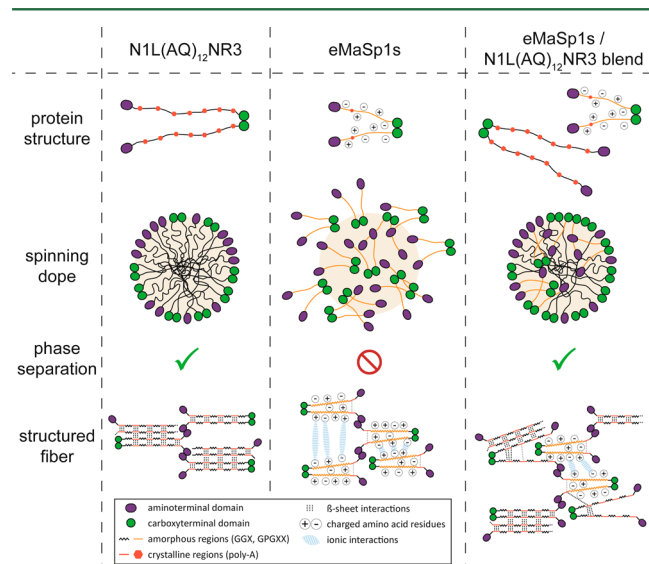


Figure 6. Schematic overview of structure and assumed morphologies of spidroins differing in molecular weight and sequence of their core domain and blends made thereof. N1L(AQ)₁₂NR3 consists of a highly repetitive hydrophobic core with 47 kDa, and eMaSp1s of a small nonrepetitive core (17 kDa) with 22 charged amino acids, inhibiting the prearrangement into micelles (no phase separation). Mechanical properties of resulting fibers are mainly based on β -sheet packing and terminal domain interactions. In a 1:1 blend, eMaSp1s is able to incorporate into N1L(AQ)₁₂NR3 micelles but interferes with a precise alignment of the (AQ)₁₂ core domain, yielding slightly decreased mechanical properties.

differences in spinning dope conformation, phase separation properties and resulting putative fiber structures. Our data support the conclusion that the controlling function of the terminal domains during spinning dope preparation and spidroin assembly is as important as the sequence or the molecular weight of the core domain.

The found features open the road for further studies, replacing the protein core domain with other spider silk core motifs with different length, charge, and molecular setup or even completely artificial ones, possibly yielding fibers with new properties depending on the respective core domain.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.biomac.7b00090.

Amino acid sequences of N1L(AQ)₁₂NR3 molecules (Figure S1). Sequence comparison of NRN and NRC domains of MaSp of different spider species (Figure S2). Coomassie-stained SDS-gel analysis of eMaSp1s, N1L(AQ)₁₂NR3, and a resolved wet-spun blend fiber made of both proteins (Figure S3). Sequence and secondary structure prediction of the eMaSp1s core domain (Figure S4) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de.

ORCID

Thomas Scheibel: 0000-0002-0457-2423

Author Contributions

Conceptualization, C.T. and T.S.; investigation, C.T.; writing (original draft), C.T.; writing (review and editing), T.S.; visualization, C.T.; supervision, T.S..

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Funding was provided by EFRE Ziel ETZ Freistaat Bayern – Tschechien Projekt Nr. 123.

■ REFERENCES

- (1) Rising, A.; Nimmervoll, H.; Grip, S.; Fernandez-Arias, A.; Storckenfeldt, E.; Knight, D. P.; Vollrath, F.; Engstrom, W. Spider silk proteins—mechanical property and gene sequence. *Zool. Sci.* **2005**, *22* (3), 273–81.
- (2) Gosline, J. M.; Guerette, P. A.; Ortlepp, C. S.; Savage, K. N. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J. Exp. Biol.* **1999**, *202* (Pt 23), 3295–303.
- (3) Hu, X.; Vasanthavada, K.; Kohler, K.; McNary, S.; Moore, A. M.; Viera, C. A. Molecular mechanisms of spider silk. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63* (17), 1986–99.
- (4) Blackledge, T. A.; Summers, A. P.; Hayashi, C. Y. Gumfooted lines in black widow cobwebs and the mechanical properties of spider capture silk. *Zoology (Munich, Ger.)* **2005**, *108* (1), 41–6.
- (5) Blackledge, T. A.; Perez-Rigueiro, J.; Plaza, G. R.; Perea, B.; Navarro, A.; Guinea, G. V.; Elices, M. Sequential origin in the high performance properties of orb spider dragline silk. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 782.
- (6) Madurga, R.; Blackledge, T. A.; Perea, B.; Plaza, G. R.; Riekel, C.; Burghammer, M.; Elices, M.; Guinea, G.; Perez-Rigueiro, J. Persistence and variation in microstructural design during the evolution of spider silk. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14820.
- (7) Ayoub, N. A.; Garb, J. E.; Tinghitella, R. M.; Collin, M. A.; Hayashi, C. Y. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PLoS One* **2007**, *2* (6), e14.
- (8) Hayashi, C. Y.; Shipley, N. H.; Lewis, R. V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24* (2–3), 271–5.
- (9) Sponner, A.; Schlott, B.; Vollrath, F.; Unger, E.; Grosse, F.; Weisshart, K. Characterization of the protein components of Nephila clavipes dragline silk. *Biochemistry* **2005**, *44* (12), 4727–36.
- (10) Andersen, S. O. Amino acid composition of spider silks. *Comp. Biochem. Physiol.* **1970**, *35* (3), 705–711.
- (11) Xu, M.; Lewis, R. V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (18), 7120–4.
- (12) Huemmerich, D.; Helsen, C. W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* **2004**, *43* (42), 13604–12.
- (13) Hinman, M. B.; Lewis, R. V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. Nephila clavipes dragline silk is a two-protein fiber. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (27), 19320–4.
- (14) Brooks, A. E.; Steinkraus, H. B.; Nelson, S. R.; Lewis, R. V. An investigation of the divergence of major ampullate silk fibers from Nephila clavipes and Argiope aurantia. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (6), 3095–9.
- (15) Hayashi, C. Y.; Blackledge, T. A.; Lewis, R. V. Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21* (10), 1950–1959.

- (16) Guerette, P. A.; Ginzing, D. G.; Weber, B. H.; Gosline, J. M. Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* **1996**, 272 (5258), 112–5.
- (17) Simmons, A. H.; Michal, C. A.; Jelinski, L. W. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science* **1996**, 271 (5245), 84–87.
- (18) Perez-Rigueiro, J.; Elices, M.; Plaza, G. R.; Guinea, G. V. Similarities and differences in the supramolecular organization of silkworm and spider silk. *Macromolecules* **2007**, 40 (15), 5360–5365.
- (19) Liu, Y.; Shao, Z.; Vollrath, F. Elasticity of spider silks. *Biomacromolecules* **2008**, 9 (7), 1782–6.
- (20) Fahnestock, S. R.; Irwin, S. L. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47 (1), 23–32.
- (21) Hinman, M. B.; Jones, J. A.; Lewis, R. V. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends Biotechnol.* **2000**, 18 (9), 374–9.
- (22) Candelas, G. C.; Cintron, J. A Spider Fibroin and Its Synthesis. *J. Exp. Zool.* **1981**, 216 (1), 1–6.
- (23) Motriuk-Smith, D.; Smith, A.; Hayashi, C. Y.; Lewis, R. V. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* **2005**, 6 (6), 3152–9.
- (24) Hagn, F.; Thamm, C.; Scheibel, T.; Kessler, H. pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk—implications for fiber formation. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50 (1), 310–3.
- (25) Askarieh, G.; Hedhammar, M.; Nordling, K.; Saenz, A.; Casals, C.; Rising, A.; Johansson, J.; Knight, S. D. Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature* **2010**, 465 (7295), 236–8.
- (26) Hagn, F.; Eisoldt, L.; Hardy, J. G.; Vendrely, C.; Coles, M.; Scheibel, T.; Kessler, H. A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* **2010**, 465 (7295), 239–42.
- (27) Heidebrecht, A.; Eisoldt, L.; Diehl, J.; Schmidt, A.; Geffers, M.; Lang, G.; Scheibel, T. Biomimetic fibers made of recombinant spidroins with the same toughness as natural spider silk. *Adv. Mater.* **2015**, 27 (13), 2189–94.
- (28) Bauer, J.; Schaal, D.; Eisoldt, L.; Schweimer, K.; Schwarzsinger, S.; Scheibel, T. Acidic Residues Control the Dimerization of the N-terminal Domain of Black Widow Spiders' Major Ampullate Spidroin 1. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 34442.
- (29) Han, L.; Zhang, L.; Zhao, T.; Wang, Y.; Nakagaki, M. Analysis of a new type of major ampullate spider silk gene, MaSp1s. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 56, 156–61.
- (30) Butt, T. R.; Edavettal, S. C.; Hall, J. P.; Mattern, M. R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expression Purif.* **2005**, 43 (1), 1–9.
- (31) Marblestone, J. G.; Edavettal, S. C.; Lim, Y.; Lim, P.; Zuo, X.; Butt, T. R. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci.* **2006**, 15 (1), 182–189.
- (32) Hu, X.; Kaplan, D.; Cebe, P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* **2006**, 39 (18), 6161–6170.
- (33) Heidebrecht, A.; Scheibel, T. Recombinant production of spider silk proteins. *Adv. Appl. Microbiol.* **2013**, 82, 115–53.
- (34) Lefevre, T.; Boudreault, S.; Cloutier, C.; Pezolet, M. Diversity of molecular transformations involved in the formation of spider silks. *J. Mol. Biol.* **2011**, 405 (1), 238–53.
- (35) Kronqvist, N.; Otkovs, M.; Chmyrov, V.; Chen, G.; Andersson, M.; Nordling, K.; Landreh, M.; Sarr, M.; Jornvall, H.; Wennmalm, S.; Widengren, J.; Meng, Q.; Rising, A.; Otzen, D.; Knight, S. D.; Jaudzems, K.; Johansson, J. Sequential pH-driven dimerization and stabilization of the N-terminal domain enables rapid spider silk formation. *Nat. Commun.* **2014**, 5, 3254.
- (36) Andersson, M.; Chen, G.; Otkovs, M.; Landreh, M.; Nordling, K.; Kronqvist, N.; Westermarck, P.; Jornvall, H.; Knight, S.; Ridderstrale, Y.; Holm, L.; Meng, Q.; Jaudzems, K.; Chesler, M.; Johansson, J.; Rising, A. Carbonic anhydrase generates CO₂ and H⁺ that drive spider silk formation via opposite effects on the terminal domains. *PLoS Biol.* **2014**, 12 (8), e1001921.
- (37) Bauer, J.; Scheibel, T. Conformational Stability and Interplay of Helical N- and C-Terminal Domains with Implications on Major Ampullate Spidroin Assembly. *Biomacromolecules* **2017**, DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01713.
- (38) Landreh, M.; Askarieh, G.; Nordling, K.; Hedhammar, M.; Rising, A.; Casals, C.; Astorga-Wells, J.; Alvelius, G.; Knight, S. D.; Johansson, J.; Jornvall, H.; Bergman, T. A pH-dependent dimer lock in spider silk protein. *J. Mol. Biol.* **2010**, 404 (2), 328–36.
- (39) Gaines, W. A.; Sehorn, M. G.; Marcotte, W. R., Jr. Spidroin N-terminal domain promotes a pH-dependent association of silk proteins during self-assembly. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (52), 40745–53.
- (40) Rammensee, S.; Slotta, U.; Scheibel, T.; Bausch, A. R. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (18), 6590–5.
- (41) Cromwell, M. E.; Hilario, E.; Jacobson, F. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J.* **2006**, 8 (3), E572–9.
- (42) Vezy, C.; Hermanson, K. D.; Scheibel, T.; Bausch, A. R. Interfacial rheological properties of recombinant spider-silk proteins. *Biointerphases* **2009**, 4 (3), 43–6.
- (43) Heim, M.; Keerl, D.; Scheibel, T. Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48 (20), 3584–96.
- (44) Dicko, C.; Kenney, J. M.; Vollrath, F. Beta-silks: enhancing and controlling aggregation. *Adv. Protein Chem.* **2006**, 73, 17–53.
- (45) Eisoldt, L.; Hardy, J. G.; Heim, M.; Scheibel, T. R. The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J. Struct. Biol.* **2010**, 170 (2), 413–9.
- (46) Stark, M.; Grip, S.; Rising, A.; Hedhammar, M.; Engstrom, W.; Hjalmar, G.; Johansson, J. Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (5), 1695–701.
- (47) Hedhammar, M.; Rising, A.; Grip, S.; Martinez, A. S.; Nordling, K.; Casals, C.; Stark, M.; Johansson, J. Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthenops australis*: implications for fiber formation. *Biochemistry* **2008**, 47 (11), 3407–17.
- (48) Exler, J. H.; Hummerich, D.; Scheibel, T. The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46 (19), 3559–62.
- (49) Lewis, R. V. Spider Silk - the Unraveling of a Mystery. *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25 (9), 392–398.
- (50) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **1974**, 13 (2), 222–45.
- (51) Papadopoulos, P.; Solter, J.; Kremer, F. Structure-property relationships in major ampullate spider silk as deduced from polarized FTIR spectroscopy. *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.* **2007**, 24 (2), 193–9.
- (52) Kauppinen, J. K.; Moffatt, D. J.; Mantsch, H. H.; Cameron, D. G. Fourier Self-Deconvolution - a Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands. *Appl. Spectrosc.* **1981**, 35 (3), 271–276.
- (53) Pauling, L. *The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals; an introduction to modern structural chemistry*, 3d ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1960.
- (54) Kumar, S.; Nussinov, R. Close-range electrostatic interactions in proteins. *ChemBioChem* **2002**, 3 (7), 604–17.
- (55) Xia, X. X.; Qian, Z. G.; Ki, C. S.; Park, Y. H.; Kaplan, D. L.; Lee, S. Y. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107 (32), 14059–63.
- (56) Brooks, A. E.; Nelson, S. R.; Jones, J. A.; Koenig, C.; Hinman, M.; Stricker, S.; Lewis, R. V. Distinct contributions of model MaSp1 and MaSp2 like peptides to the mechanical properties of synthetic major ampullate silk fibers as revealed in silico. *Nanotechnol., Sci. Appl.* **2008**, 1, 9–16.

Supporting Information for

**Recombinant production, characterization and
fiber spinning of an engineered short major
ampullate spidroin (MaSp1s)**

Christopher Thamm[#] and Thomas Scheibel^{ #, †, §, ‡, ⊥}*

[#]Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth,
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[‡]Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), Universität Bayreuth,
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[¶]Bayerisches Polymerinstitut (BPI), Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[§]Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), Universität Bayreuth,
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[†]Institut für Bio-Makromoleküle (bio-mac), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30,
95440 Bayreuth, Germany

[⊥]Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440
Bayreuth, Germany

To whom correspondence should be addressed: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

N1L

10	20	30	40	50
GQANTPWSSK	ANADAFINSF	ISAASNTGSF	SQDQMEDMSL	IGNTLMAAMD
60	70	80	90	100
NMGGRITPSK	LQALDMAFAS	SVAEIAASEG	GDLGVTTNAI	ADALTSAFYQ
110	120	130	140	150
TTGVVNSRFI	SEIRSLIGMF	AQASANDVYA	SAGSGSGGGG	YGASSASAAS
160	170	180		
ASAAAPSGVA	YQAPAQAQIS	FTLRGQQPVS		

Module A

10	20
GPYGPASAA	AAAAGGYGPG SGQQ

Module Q

10	20
GPGQQGPGQQ	GPGQQGPGQQ

NR3

10	20	30	40	50
GAASAAVSVG	GYGPQSSSAP	VASAAASRLS	SPAASSRVSS	AVSSLVSSGP
60	70	80	90	100
TNQAALSNTI	SSVVSQVSAS	NPGLSGCDVL	VQALLEVVSA	LVSILGSSSI
110	120			
GQINYGASAQ	YTQMVQSVA	QALAG		

Figure S1. Amino acid sequences of N1L(AQ)₁₂NR3 domains and motifs.

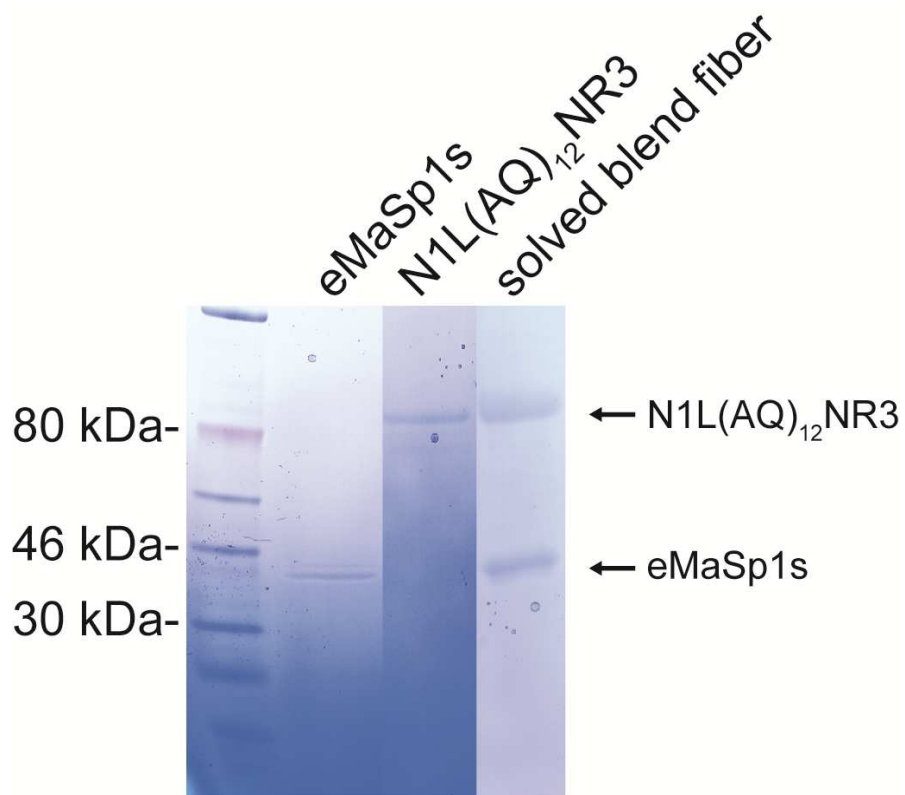


Figure S3. Coomassie stained SDS-gel analysis of eMaSp1s (purity >95%, determined using densitometry), N1L(AQ)₁₂NR3 and a resolved wet-spun blend fiber made of both proteins (eMaSp1s: 42.7 kDa, N1L(AQ)₁₂NR3: 87.7 kDa).



Figure S4. Sequence and secondary structure prediction of the eMaSp1s core domain. Prediction based on the method of Chou and Fasman,¹ typically used for analyzing soluble proteins.

REFERENCES

1. Chou, P. Y.; Fasman, G. D., Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **1974**, *13* (2), 222-45.

6.2. TEILARBEIT II

Characterization of hydrogels made of a novel spider silk protein eMaSp1s and evaluation for 3D printing

Thamm, C., DeSimone, E. and Scheibel, T.

Veröffentlich in *Macromolecular Bioscience*. In print

2017

Abdruck mit freundlicher Genehmigung Verlages John Wiley and Sons.



Characterization of Hydrogels Made of a Novel Spider Silk Protein eMaSp1s and Evaluation for 3D Printing

Christopher Thamm, Elise DeSimone, and Thomas Scheibel*

Recombinantly produced spider silk proteins have high potential for bio-engineering and various biomedical applications because of their biocompatibility, biodegradability, and low immunogenicity. Here, the recently described small spider silk protein eMaSp1s is assembled into hydrogels, which can be 3D printed into scaffolds. Further, blending with a recombinantly produced MaSp2 derivative eADF4(C16) alters the mechanical properties of the resulting hydrogels. Different spider silk hydrogels also show a distinct recovery after a high shear stress deformation, exhibiting the tunability of their features for selected applications.

(MaSp1 and MaSp2), each exhibiting a large repetitive core domain, flanked by nonrepetitive amino- and carboxyterminal domains.^[12–15] Core domains comprise polyalanine motifs, which form β -sheet crystals and are responsible for the high tensile strength of spider silk fibers. In addition, glycine-rich motifs form an amorphous matrix, which surrounds the β -sheet crystals, and this matrix is responsible for the good elasticity.^[16–18] The spidroins contain terminal domains needed for proper storage and assembly, which have α -helical structure.^[19–23]

1. Introduction

Orb-weaver spiders can produce up to seven different silk types in specific glands for applications such as offspring protection, prey wrapping or building the spider web.^[1–3] The most frequently investigated silk type is the dragline silk (MA: major ampullate silk), which forms the frame and radii of an orb web.^[4–7] Some of the notable characteristics of MA silk are its high toughness, biocompatibility, and low immunogenicity.^[7–11] MA silk is typically composed of two classes of spider silk proteins (i.e. spidroins), major ampullate spidroin 1 and 2

Large scale production of spider silk by farming is not feasible due to the cannibalistic behavior of most spider species.^[24] Therefore, spidroins have to be recombinantly produced in host organisms like *Escherichia coli* to have appropriate amounts for processing into fibers and other morphologies.^[25,26] In particular, developing cost-effective methods for producing 3D morphologies of recombinant spider silk is an important endeavor for this field.^[27] Recently, a short MaSp1 (MaSp1s) derivative has been described, expanding the list of major ampullate spidroin classes.^[28] This protein comprises only 439 amino acids in total, consisting of a small nonrepetitive core and two flanking terminal domains. An engineered variant thereof, eMaSp1s, could be successfully recombinantly produced and spun into fibers, and the resulting fibers had good mechanical properties.^[29]

In addition to fiber assembly, other morphologies were investigated to expand the applicability of this protein. Among these non-native morphologies are hydrogels, which are 3D polymer networks absorbing water in excess of over 95% (w/w).^[30–32] Hydrogels made of recombinant spidroins have been successfully produced in the past, and properties thereof can be controlled by adjusting protein concentration, pH, temperature, ion composition, and ion concentration.^[33–36] They assemble upon concentration-dependent gelation in which β -sheet rich silk fibrils form a stable physically cross-linked 3D network.^[33,34,37] The structure, the rheological properties (i.e., a shear thinning behavior), and the biocompatibility of spider silk hydrogels make them promising candidates for biomedical applications.^[38,39] One particularly interesting use of hydrogels is in 3D printing to develop biologically functional constructs. To the best of the authors' knowledge, there is only one case where recombinant silk proteins were used in an extrusion printing process to produce biofabricated scaffolds.^[35] Conversely, there are many interesting examples of using silk fibroin of silkworms for 3D printing. However, a disadvantage of extrusion printing of silk fibroin is that blending with other

C. Thamm, E. DeSimone, Prof. T. Scheibel
Lehrstuhl Biomaterialien
Fakultät für Ingenieurwissenschaften
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany
E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

Prof. T. Scheibel
Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG)
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel
Bayerisches Polymerinstitut (BPI)
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel
Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB)
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel
Institut für Bio-Makromoleküle (bio-mac)
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel
Bayreuther Materialzentrum (BayMAT)
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

DOI: 10.1002/mabi.201700141

biomaterials such as gelatin and hydroxyapatite is required for the hydrogels to be printable.^[40,41] Further, silk fibroin has also been utilized in inkjet printing, a process where the precursor solution is printed instead of the preformed hydrogel, and which works by similar principles to an inkjet printer. This technique allows higher resolution than extrusion printing, but yields smaller constructs.^[38] Although inkjet printing is not effective for tissue engineering, it is much more appropriate for other applications, for example, silk fibroin was used as an ink for effective development of biosensor arrays.^[42]

In this study, we successfully produced hydrogels of eMaSp1s and performed a rheological and structural analysis. Strikingly, blending with an engineered MaSp2 variant eADF4(C16) significantly altered the mechanical properties of the hydrogels.

2. Experimental Section

All chemicals used in this study were of analytical grade and acquired from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). Double-distilled water (ddH₂O) was prepared using a Millipore system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

2.1. Recombinant Production and Purification of Spidroins

The engineered protein MaSp1s (eMaSp1s) consists of a small core domain, flanked by nonrepetitive termini and has a molecular weight of 43 kDa. eMaSp1s was produced recombinantly in *E. coli* and purified using affinity chromatography steps and ammonium sulfate precipitation as described previously.^[29]

The recombinant spidroin eADF4(C16) was produced and purified as previously described.^[25]

2.2. Hydrogel Formation

Hydrogels were produced following the protocol reported previously.^[33] Briefly, lyophilized proteins were solved in 6 M guanidinium thiocyanate and then dialyzed against 10 × 10^{−3} M Tris/HCl, pH 7.5 overnight at room temperature using dialysis membranes with a molecular weight cutoff of 6000–8000 Da. Subsequent dialysis against 25% (w/v) poly(ethylene glycol) (PEG) (35 kDa) removed water by osmotic stress, allowing protein concentrations of up to 70 mg mL^{−1}.^[43,44] Final concentrations of the protein solutions were determined photometrically after PEG-dialysis. Since gelation is faster at higher temperatures,^[33] solutions were gelled at 37 °C for 60 h and hydrogels were stored at 4 °C for 24 h before analysis.

2.3. Analysis of Gelation Kinetics

For gelation analysis, 150 µL of concentrated protein solutions were added to Nunc 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany), incubated at 37 °C and analyzed at various time points for changes in turbidity. Turbidity changes upon gelation of the protein solution were monitored at 570 nm using a Microplate Reader (Mithras LB 940, Berthold

Technologies, Bad Wildbad, Germany) in absorbance mode. For each protein concentration four samples (*n* = 4) were analyzed.

2.4. Fourier Transform Infrared (FTIR) and Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

FTIR measurements were recorded in absorbance mode using a Bruker Tensor 27 IR spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany). Lyophilized hydrogel and protein samples were placed on an attenuated total reflection (ATR)-crystal and pressed with a stamp. Each measurement comprised a 60-scan interferogram with a 2 cm^{−1} resolution between 4000 and 800 cm^{−1} and atmospheric compensation. The amide I region (1590–1720 cm^{−1}) was analyzed by Fourier self-deconvolution (FSD) using OPUS software (version 6.5). Signals were assigned to protein secondary structure elements according to Hu et al.^[45]

Far-ultraviolet (UV) CD measurements were performed using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt, Germany). Protein concentrations were adjusted to 0.2 mg mL^{−1} using 10 × 10^{−3} M sodium phosphate buffer, pH 7.5, and cuvettes were used with a path length of 0.1 cm.

2.5. Rheological Properties

Stress–strain curves of eMaSp1s hydrogels were measured according to a protocol established previously.^[33,35] Briefly, the deformation curves of various hydrogels were monitored for 10 min using a flow measurement mode at an AR-G2 rheometer (TA instruments, New Castle, DE, USA) at a constant shear rate of 3.0 × 10^{−3} s^{−1} with 25 mm plate geometry and a 100 µm gap. To analyze the viscosity behavior of the hydrogels, steady state flow measurements were performed with shear rates increasing from 0.01 to 500 s^{−1}. In all measurements a solvent trap with a wet sponge was used to reduce evaporation. Shear (*G*) and elastic (*E*) moduli were calculated as described in one of the previous publications^[33] according to Hooke's law using the Poisson's ratios published by Urayama et al.^[46] Three samples (*n* = 3) were measured for each experimental group, and one representative curve is shown per group.

Hydrogels were additionally evaluated for recovery by measuring the storage and loss modulus before and after a large deformation which induces either “fluid-like” viscosity (40 s^{−1} shear rate) or “soft solid-like” viscosity (0.2 s^{−1} shear rate). This was conducted by taking the hydrogels through a three step analysis: the first step was a measurement before deformation for 10 min (600 s) by small oscillations (10 rad s^{−1}, 0.5% strain). The oscillation program and rate was based on protocols previously written.^[47–49] The linear strain value was determined by the analysis of the stress–strain curves and the shear rate from data as previously established.^[33,35] The second step was a large deformation step in a flow mode for either 40 s^{−1} shear rate for 1 s or 0.2 s^{−1} shear rate for 10 s. The third step was to measure the modulus after deformation over a period of 5 min (300 s) by small oscillations (10 rad s^{−1}, 0.5% strain) to see if there is any recovery. Three samples (*n* = 3) were measured for each experimental group, and one representative curve is shown per group.

2.6. Congo Red (CR) and Thioflavin T (ThT) Binding Experiments

2.6.1. CR

Soluble protein and solubilized hydrogels were diluted to a protein concentration of 0.2 mg mL^{-1} and mixed with $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ CR in $10 \times 10^{-3} \text{ M}$ Tris/HCl, pH 7.5. Ultraviolet–visible (UV-vis) spectrometry was performed using a Cary 50 Bio spectrometer (Varian, Darmstadt, Germany) after 30 min of incubation time. Baselines without CR were recorded at the same protein concentration to correct the spectra for light scattering.

2.6.2. ThT

Soluble protein and solubilized hydrogels were diluted to a protein concentration of 1.0 mg mL^{-1} and mixed with $15 \times 10^{-6} \text{ M}$ ThT for 10 min in $10 \times 10^{-3} \text{ M}$ Tris/HCl, pH 7.5. Fluorescence spectra were recorded using a Jasco FP-6500 fluorescence spectrometer with a 3 mm path length at an excitation wavelength of 450 nm (Jasco, Groß-Umstadt, Germany).

2.7. Transmission Electron Microscopy (TEM) Imaging

For TEM analysis, eMaSp1s hydrogels were resolubilized manually by harsh mixing in ddH₂O, followed by centrifugation at $17\,700 \text{ g}$ for 30 min, and $5 \mu\text{L}$ of the resulting protein solution (1.0 mg mL^{-1}) were spotted on supports (Pioloform 100-mesh copper grids and Formvar 200-mesh copper grids (Plano GmbH, Wetzlar, Germany)), incubated for 2 min, washed two times with $5 \mu\text{L}$ ddH₂O, and stained using $5 \mu\text{L}$ of 2% uranyl acetate solution. For atomic force microscopy (AFM) analysis, $30 \mu\text{L}$ of protein solution (1.0 mg mL^{-1}) was spotted on freshly cleaved mica plates ($\varnothing 10 \text{ mm}$, V1 grade, Plano GmbH, Wetzlar, Germany). TEM samples were dried for at least 20 h at 20°C before imaging. TEM imaging of solubilized hydrogel samples was performed with a JEM-2100 transmission electron microscope (JEOL GmbH, Freising, Germany) operated at 80 kV. Images were recorded using a 4000×4000 charge-coupled device camera (UltraScan 4000, Gatan, Pleasanton, CA, USA) and Gatan Digital Micrograph software (version 1.83.842).

2.8. AFM Imaging

For AFM analysis, eMaSp1s hydrogels were prepared in solution identically as for TEM, and $30 \mu\text{L}$ protein solution (1.0 mg mL^{-1}) were spotted on freshly cleaved mica plates ($\varnothing 10 \text{ mm}$, V1 grade, Plano GmbH, Wetzlar, Germany). AFM samples were dried for at least 20 h at 20°C before imaging. AFM scanning of dried samples was done using

a Dimension™ 3100 device equipped with a NanoScope V controller (Veeco Instruments Inc., Plainview, NY, USA) using Si₃N₄ cantilevers (OMCLAC160TS, Olympus, spring constant of 42 N m^{-1} , resonance frequency of 300 kHz, tip radius less than 7 nm) and operating in Tapping-Mode. AFM scans were processed using NanoScope Analysis software version 1.40r3 (Bruker, Santa Barbara, CA, USA).

2.9. Scanning Electron Microscopy (SEM) Imaging

To analyze morphological structure via SEM, hydrogels were chemically fixed using a fixation buffer (2.5% (v/v) glutaraldehyde, $80 \times 10^{-3} \text{ M}$ HEPES, $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ CaCl₂, pH 7.3) at room temperature followed by incubation for 4 h at 4°C . Then, samples were washed with water four times, frozen at -80°C and freeze dried. SEM pictures of dry platinum sputtered samples (2 nm platinum coating; Cressington sputter coater 108auto, Watford, United Kingdom) were taken at an accelerating voltage of 2.5 kV, using a scanning microscope Leo 1530 Gemini (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.10. Optical Imaging

Visualization of hydrogel fibrils was performed after adding ThT, using an inverted optical microscope (Leica DMI8) with an excitation wavelength of 480 nm using the software Leica V4.3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.11. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC of freshly produced hydrogels was conducted using a DSC1 (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) by applying between 14 and 16 mg of hydrogel under nitrogen-atmosphere conditions and a heating rate of $20^\circ\text{C min}^{-1}$.

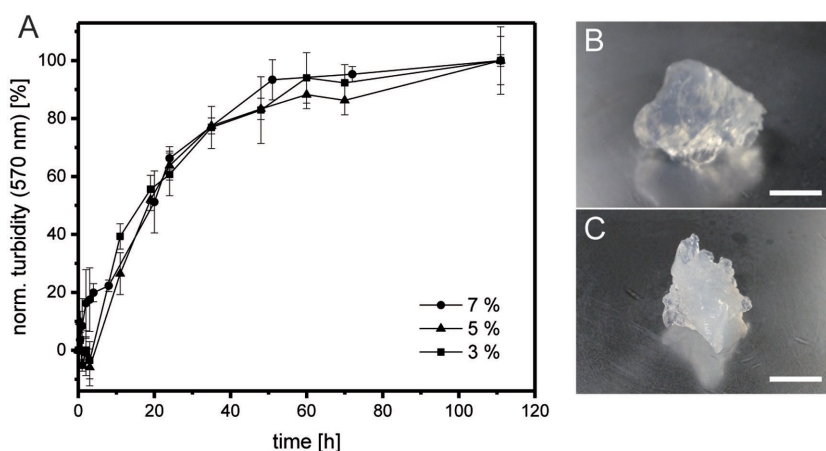


Figure 1. A) Turbidity changes of 3%, 5%, and 7% (w/v) eMaSp1s solutions over time incubated at 37°C . Changes in turbidity were monitored at 570 nm and reflect the rate of hydrogel formation. Each data point was averaged from three independent samples ($n = 3$), and standard deviations are indicated for each time point. Photographs of B) 3% (w/v) and C) 7% (w/v) eMaSp1s hydrogels. Scale bars: 0.5 cm.

2.12. Dispense-Plotting

Robotic dispensing was performed using a 3D Discovery (regenHU) in a laminar-flow hood. The print head (DD-135N, print head for contact dispensing) operated in the y,z -plane and the collector along the x -axis. Printing was conducted at room temperature in a pressurized 3cc syringe (regenHU). Dispensing was achieved by pneumatic-driven piston driving hydrogel through a needle with an inner diameter of 0.33 mm. The flow was regulated by pressure (0.5 bar), and the printing velocity was 20 mm s^{-1} . The printed constructs were imaged using a stereo microscope (Leica M205C, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.13. Stereomicroscopy

The Leica M205C stereomicroscope (Wetzlar, Germany) was used to capture images of printed scaffolds. The images of hydrogels were taken on light reflected from dark field using a $0.63\times$ objective with a polarization lens. One representative scaffold was imaged per experimental group.

3. Results and Discussion

3.1. Assembly of eMaSp1s Hydrogels

It has been previously shown that the recombinantly produced spider silk protein eADF4(C16) (a 48 kDa MaSp2 derivative, consisting of 16 repetitive consensus sequence modules of the core domain of *Araneus diadematus* fibroin 4 (ADF4), containing polyalanine stretches (A) and glycine/proline-rich areas (Q), (Figure S1, Supporting Information)) can spontaneously self-assemble into hydrogels at concentrations between 5 and 70 mg mL^{-1} .^[33,50] Similarly, eMaSp1s self-assembled into hydrogels at concentrations between 20 and 70 mg mL^{-1} .

The produced eMaSp1s hydrogels exhibited good storage stability, remaining intact when water or buffer was added. With this successful processing into hydrogels, eMaSp1s is one of the few recombinantly produced spider silk proteins, which are able to form both wet-spun solid fibers^[29] and stable hydrogels.

The influence of protein concentration on the rate of gelation was analyzed by turbidity measurements at 570 nm for five consecutive days (Figure 1A). Gelation began after a few hours and was almost complete after 60 h; notably, the gelation rate was almost independent of protein concentration. Although the gelation rate was comparable, 7% (w/v) eMaSp1s hydrogels showed a slightly increased turbidity in the assembled hydrogel in comparison to lower protein concentrations, which could be confirmed visually (Figure 1B,C). As also described by Schacht et al.^[33] for a different recombinant spider silk protein, the gelation process was highly reproducible at all eMaSp1s concentrations.

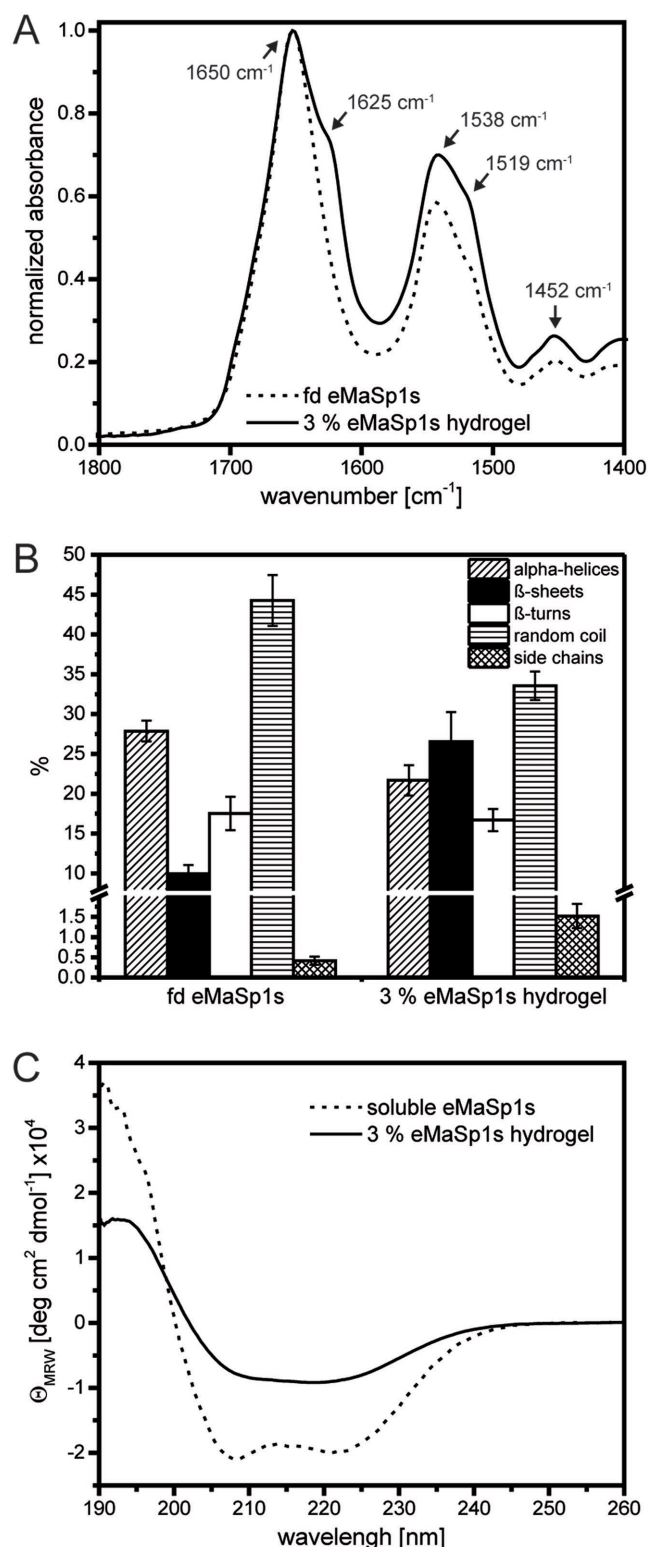


Figure 2. FT-IR spectroscopy showing (A: amide I and II region) B) secondary structure distribution based on FTIR spectra of a 3% (w/v) eMaSp1s hydrogel in comparison to freeze-dried (fd) eMaSp1s. C) CD spectra of soluble eMaSp1s (0.2 mg mL^{-1}) versus hydrogels made thereof.

3.2. Structural Analysis of eMaSp1s in Solution and in Hydrogels

It was recently shown that eMaSp1s has α -helical secondary structure in aqueous solution, dominated by its helically folded terminal domains. However, during hydrogel formation, spider silk proteins structurally convert into β -sheet rich structures.^[33,51]

Therefore, resuspended hydrogels were analyzed using FTIR and CD spectroscopy to determine their secondary structure content (Figure 2A; Table S1, Supporting Information). In FTIR spectra, the absorbance maxima at 1625 and 1519 cm^{-1} indicated the presence of β -sheets. FSD of the amide I band (Figure 2B) showed that the overall β -sheet content increased from 9% to 27%, the α -helical content decreased from 28% to 22% and the random coil content decreased from 44% to 35% upon hydrogel formation. All hydrogels showed a maximum at 963 cm^{-1} , indicating that the polyaniline regions were in β -sheet conformation (data not shown).^[52] These findings also suggested that β -sheet formation occurred preliminary in the previously unfolded core domain of MaSp1s while the folded termini mainly retained their helical structure during hydrogel formation.

CD spectroscopy confirmed the FTIR data, showing a change in ellipticity which indicated the additional formation of β -sheet structures, lowering the overall signal intensities (Figure 2C).

3.3. β -Fibrillization During eMaSp1s Hydrogel Formation

Hydrogels were resuspended in buffer and analyzed by TEM, AFM, CR staining, and ThT staining (Figure 3A,B).^[53,54]

TEM as well as AFM revealed fibrillar structures (Figure 3A,B), exhibiting a length of around 200–500 nm, average diameters of 15 nm (Figure 3A), and heights in the range of 1.0–1.3 nm (Figure 3B). Length and diameter of eMaSp1s fibrils is consistent with values reported earlier for recombinant spider silk fibrils.^[55,56]

The absorbance spectrum of CR redshifted upon binding to the β -sheets within the nanofibrils (Figure 3B), and ThT fluorescence significantly increased at 482 nm (Figure 3C), both confirming the formation of β -sheet containing fibrils during eMaSp1s hydrogel formation.

3.4. Rheological Characterization of eMaSp1s Hydrogels

Previously described recombinant spider silk hydrogels made from eADF4(C16) showed elastic moduli in a range of 1–30 kPa.^[33,57] The mechanical properties of eMaSp1s hydrogels were determined using rheology (Figure 4). All eMaSp1s

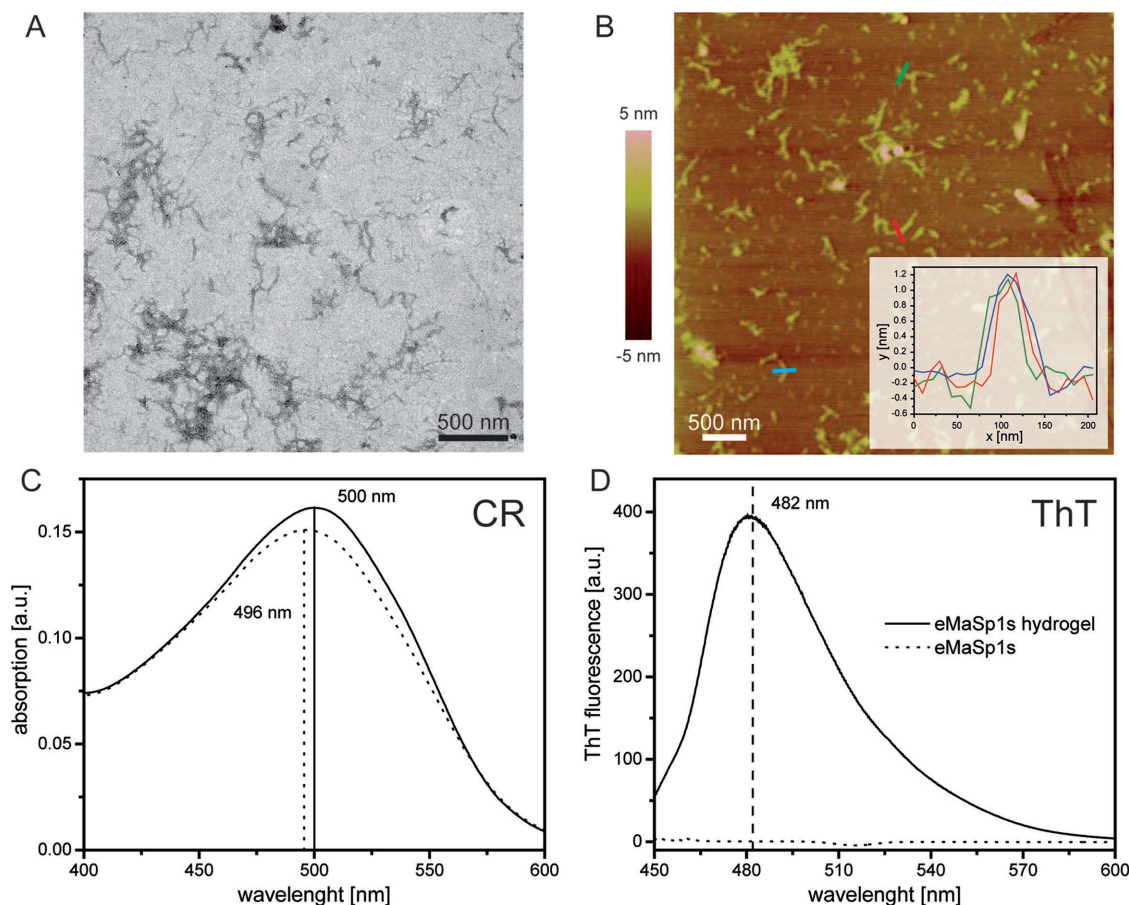


Figure 3. Identification and morphology of β -sheet fibrils in 3% (w/v) eMaSp1s hydrogels. A) TEM image and B) AFM image of eMaSp1s fibrils. The color bar on the left side of the AFM image presents heights from -5 nm (dark brown) to 5 nm (white). The inset shows height profiles of three randomly selected eMaSp1s fibrils. C) CR and D) ThT spectra of samples gained from eMaSp1s hydrogels and freshly purified eMaSp1s in solution.

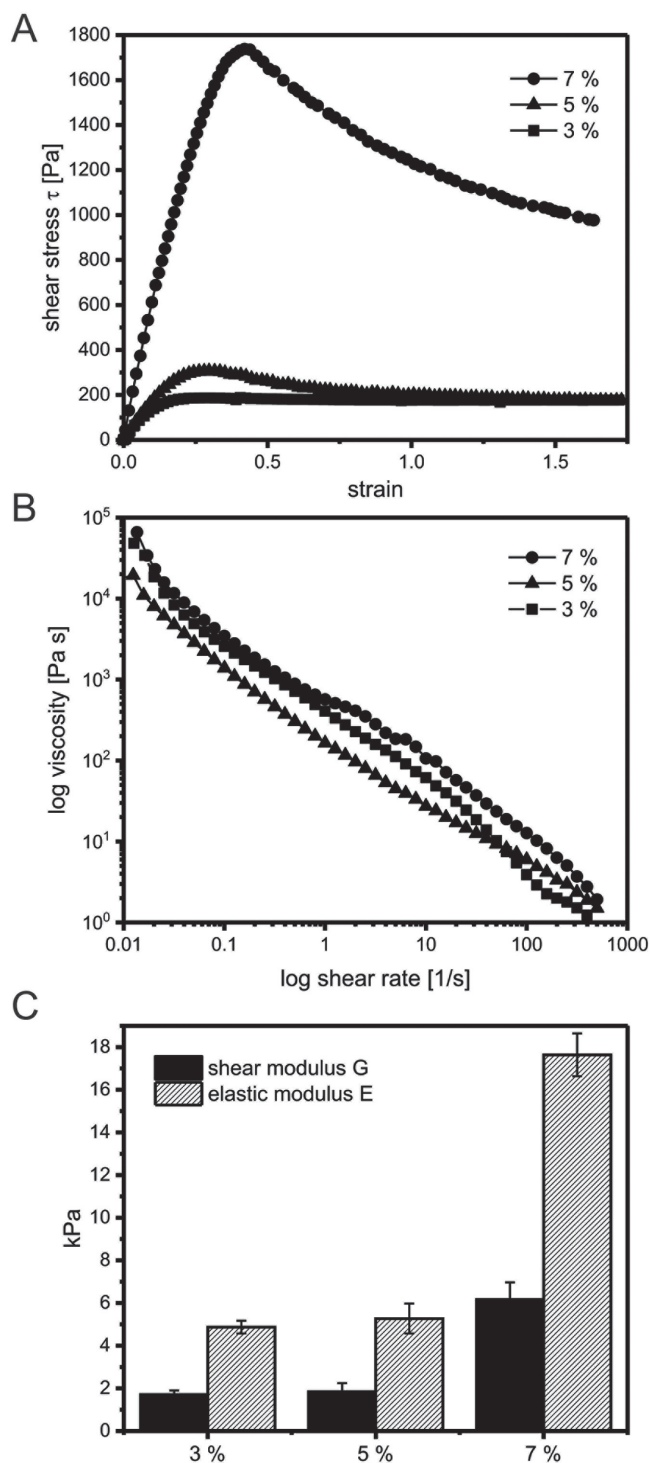


Figure 4. Rheological measurements (stress–strain and flow curves) of 3%, 5%, and 7% (w/v) eMaSp1s hydrogels at 20 °C. Each hydrogel was measured in a single experiment, and representative curves are shown. A) Stress–strain and B) flow curves of eMaSp1s hydrogels at different protein concentrations. C) Shear moduli and elastic moduli of eMaSp1s hydrogels.

hydrogels showed slightly inferior values in maximum shear stress compared to that of previously determined eADF4(C16) hydrogels at the same concentration (Figure 4A).^[33,56,58] Shear

and elastic moduli increased with increasing protein concentration; this is likely due to less eMaSp1s nanofibril mobility in highly concentrated solutions, causing higher mechanical stiffness of the hydrogels (Figure 4C).^[59]

To analyze whether the hydrogels also showed shear thinning behavior as previously shown for hydrogels made of eADF4(C16),^[60] eMaSp1s hydrogels were characterized using a steady state flow mode and exhibited shear thinning at these conditions (Figure 4B).

Taken together, the mechanical properties of eMaSp1s hydrogels are in the same regime in comparison to that of eADF4(C16) hydrogels.

Something notable about Figure 4A,C is that there is a sharp increase in the stiffness of the hydrogels from 5% to 7% (w/v), a behavior that was also observed for eADF4(C16) hydrogels.^[33] Although the studies here are not sufficient to explain this behavior, the authors would speculate this is because working with higher concentration within the starting solution triggers aggregation, resulting in a mixture of fibrillar network formation with protein aggregation. It was decided from this point that only 3% (w/v) hydrogels would be tested; the desired future application of these hydrogels is soft tissue engineering or drug delivery, and as 3% and 5% (w/v) had nearly the same modulus, it was sensible to use the formulation which requires less protein and which also yields slightly larger pore sizes.

Next, concentrated eADF4(C16) and eMaSp1s solutions were mixed and then assembled into hydrogels. Surprisingly, mixed hydrogels made of equal amounts of both proteins showed a significantly increased shear stress in comparison to those made of only a single protein (Figure 5A).

To analyze the basis of this unexpected behavior, samples were freeze dried and investigated by SEM. Hydrogels made of eADF4(C16) showed sheet-like morphology with sheet-like pores around 100 μm (Figure 5C).^[33] By contrast, eMaSp1s hydrogels revealed a morphology with predominantly round pores at a smaller size range of 20–40 μm (Figure 5B). Blend hydrogels appeared to be composed of a mixture of both morphologies (Figure 5C).

Next, the thermal stability was characterized by DSC (Figure 5E). After initial water removal, all hydrogels were stable upon ≈150 °C. DSC measurements showed a main endothermic peak of eMaSp1s at 281 °C, of eADF4(C16) at 330 °C and of the 1:1 blend hydrogel at 311 °C. In summary, although there is a special structure which results from the blending, the thermal stability of the blend was not noticeably increased but was in between that of the single protein hydrogels, indicating a blend with likely phase-separated eADF4(C16) and eMaSp1s areas (i.e., reflecting an interpenetrating network). Therefore, it was not a molecular interaction between both proteins, but rather the interpenetration, yielding the increased mechanical properties.

3.5. 3D Printing and Oscillation Experiments

eMaSp1s, eMaSp1s blend, and eADF4(C16) hydrogels as a control were examined for printability using similar parameters as those reported previously for eADF4(C16) hydrogels.^[35]

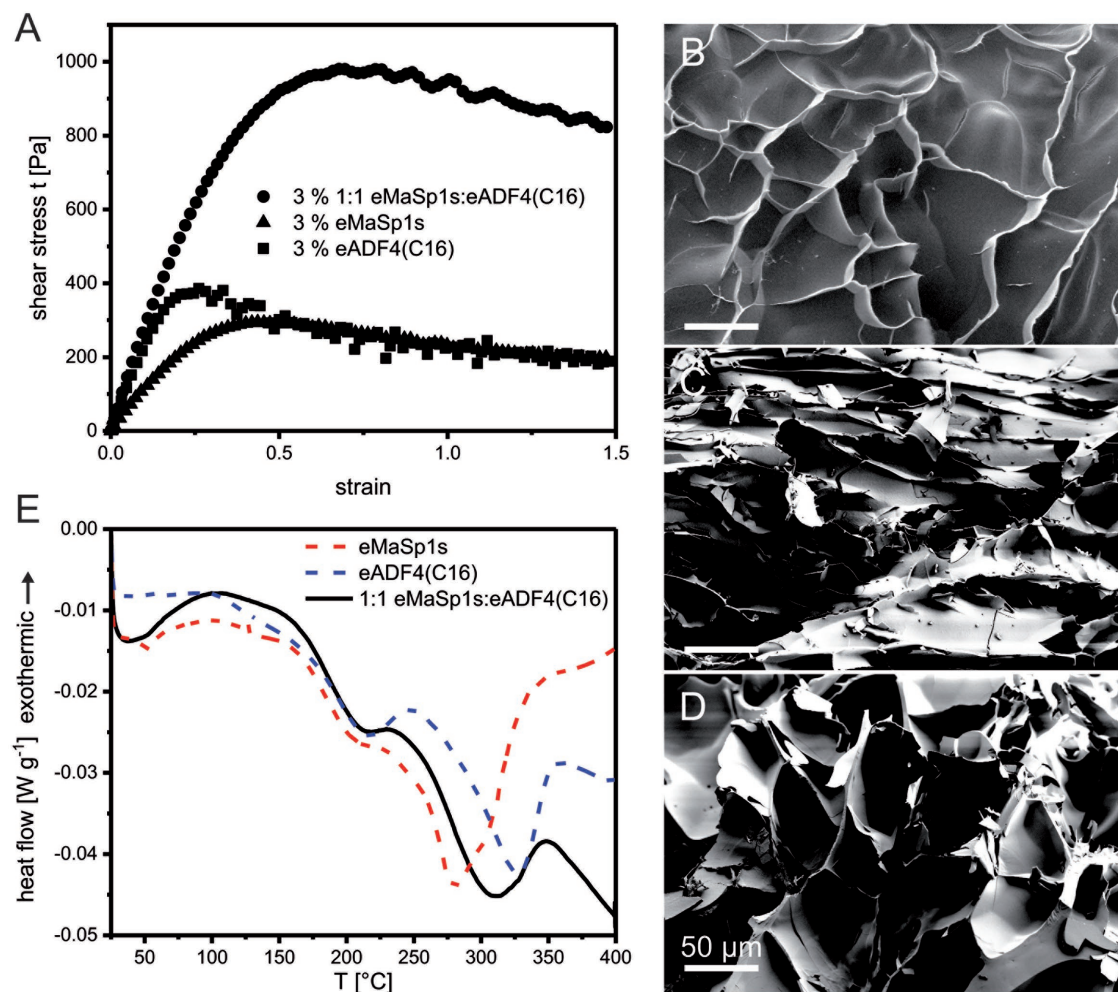


Figure 5. A) Rheological, B–D) SEM, and E) DSC analysis of 3% (w/v) blend hydrogels made of eMaSp1s and eADF4(C16) in a 1:1 (w/w) ratio compared to single-protein hydrogels. SEM images show hydrogels made of B) eMaSp1s, C) eADF4(C16), and D) 1:1 (w/w) blend hydrogel.

Dispense plotted hydrogels of eMaSp1s were not as form stable as those made of eADF4(C16) (Figure 6). This was not expected considering the shear thinning behavior of the protein combined with a higher modulus as determined by stress–strain measurements (Figure 4). To identify the origin of this behavior, oscillation experiments were conducted to evaluate the shear modulus before and after a large deformation with an experimental set-up and parameter determination similar to protocols previously reported.^[47–49]

Based on the change in the shear storage modulus of the different hydrogels before and after “fluid-like” viscosity deformation, MaSp1s and the blend were not able to completely recover their mechanical properties after deformation (Figure 7A). On the other hand, eADF4(C16) experienced a permanent increase in the loss modulus (Figure 7C). This shear rate resulted in the hydrogel exhibiting a “fluid-like” behavior with viscosities less than 10 Pa s (Figure S2, Supporting Information). In the case of the “soft solid-like” behavior, the blend and eADF4(C16) seemed to recover instantaneously at viscosities greater than 100 Pa s (Figure S2, Supporting Information), but the eMaSp1s hydrogel did not recover

at all. eADF4(C16) showed a slight, irreversible increase in the loss modulus, and in this case the blend did as well (Figure 7D).

These results were confirmed by observing the apparent yield stress using stress–strain measurements. Directly after printing, the apparent yield stress decreased significantly in the case of hydrogels made of eADF4(C16), eMaSp1s, and the blend (Figure S3, Supporting Information). Interestingly however, in this case, the eMaSp1s hydrogels also recovered their original apparent yield stress, although with a much slower recovery time.

4. Conclusion

Hydrogels of the spider silk protein eMaSp1s were assembled and characterized. Hydrogels showed a fibrillar morphology with increased β -sheet content and shear thinning properties as well as shear and elastic moduli different to that of previously produced recombinant spider silk hydrogels based on MaSp2 derivatives eADF4(C16).

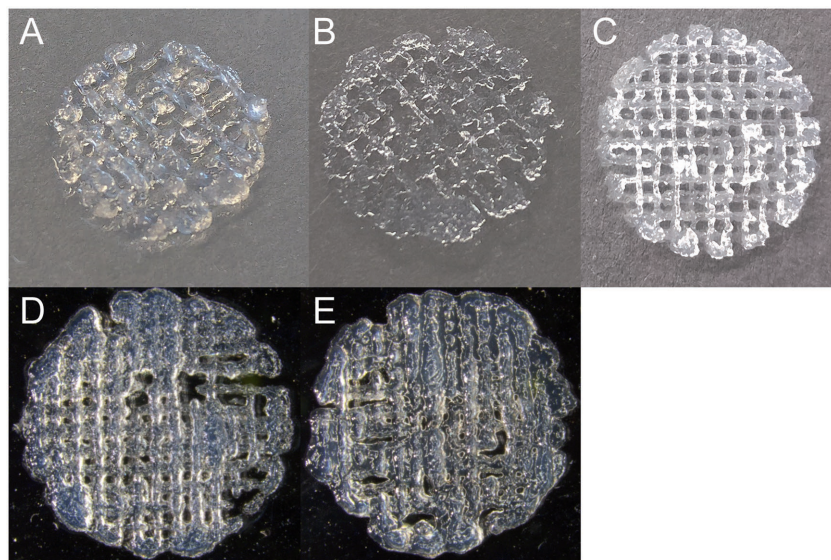


Figure 6. Photographs of 3D dispense plotted scaffolds: A) 3% (w/v) 1:1 eADF4(C16):eMaSp1s blend, B) 3% (w/v) eMaSp1s, and C) 3% (w/v) eADF4(C16). Additionally, stereomicroscopic images of D) 3% (w/v) 1:1 eADF4(C16):eMaSp1s blend and E) 3% (w/v) eMaSp1s were taken. The two-layer scaffolds had a diameter of either (A–C) 1.0 or (D,E) 1.8 cm.

Further, the hydrogels were strengthened by blending with eADF4(C16). However, under high shear rates, the eMaSp1s hydrogels and hydrogel blends were not able to recover within minutes, unlike eADF4(C16). Therefore, although the eMaSp1s hydrogels are not suitable for 3D printing, they could be envisioned for other applications such as injectable drug delivery reservoirs, which will be investigated in the future.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

This work was supported by the European Union, Project ID 123 ("green bio-based polymers"). The authors thank Dr. Hendrik Bargel for SEM imaging, Dr. Martin Humenik for assistance with AFM measurements, and Tamara Aigner for TEM imaging.

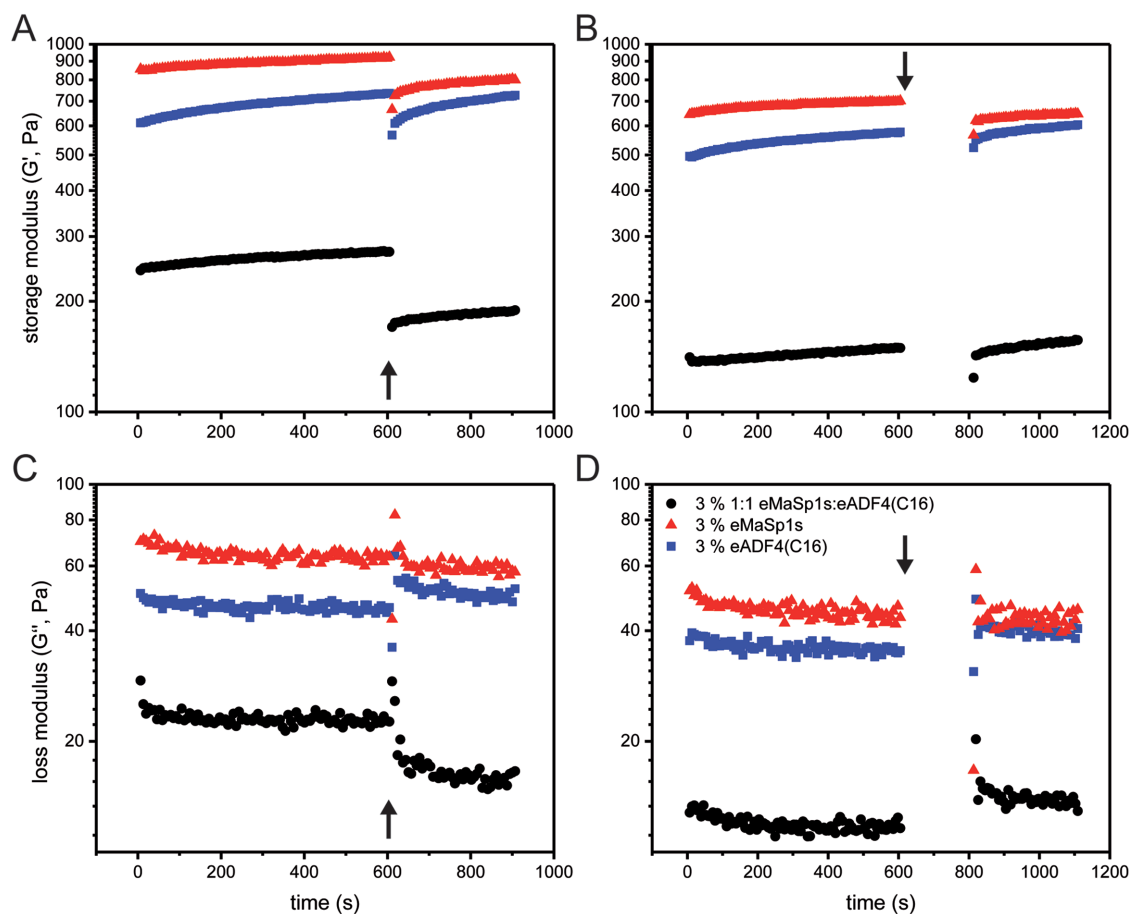


Figure 7. Time sweep experiments showing the recovery behavior of hydrogels after large strain deformations at A,C) 0.2 s^{-1} or B,D) 40 s^{-1} shear rate as measured by changes in (A,B) shear storage modulus and (C,D) shear loss modulus. Hydrogels were measured before deformation for 10 min (600 s) and after deformation for 5 min (300 s) by small oscillations within the linear behavior of the hydrogel as determined by previous hydrogel tests (10 rad s^{-1} , 0.5% strain). The x-axis label is shared for (A) and (C) and (B) and (D), and the y-axis label is shared for (A) and (B) and (C) and (D). Each curve is one representative sample, and an arrow indicates the start of the deformation phase.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

biopolymers, circular dichroism, FTIR, hydrogels, major ampullate spidroin, rheology

Received: April 19, 2017

Revised: June 26, 2017

Published online:

- [1] A. Rising, H. Nimmervoll, S. Grip, A. Fernandez-Arias, E. Storckenfeldt, D. P. Knight, F. Vollrath, W. Engstrom, *Zool. Sci.* **2005**, 22, 273.
- [2] S. L. Stauffer, S. L. Coguill, R. V. Lewis, *J. Arachnol.* **1994**, 22, 5.
- [3] F. Vollrath, *J. Biotechnol.* **2000**, 74, 67.
- [4] T. A. Blackledge, C. Y. Hayashi, *J. Exp. Biol.* **2006**, 209, 2452.
- [5] M. Andersson, L. Holm, Y. Ridderstrale, J. Johansson, A. Rising, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 2945.
- [6] M. Denny, *J. Exp. Biol.* **1976**, 65, 483.
- [7] M. Heim, D. Keerl, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 3584.
- [8] F. Vollrath, P. Barth, A. Basedow, W. Engstrom, H. List, *In Vivo* **2002**, 16, 229.
- [9] G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. L. Kaplan, *Biomaterials* **2003**, 24, 401.
- [10] J. M. Gosline, P. A. Guerette, C. S. Ortlepp, K. N. Savage, *J. Exp. Biol.* **1999**, 202, 3295.
- [11] L. Römer, T. Scheibel, *Chem. Unserer Zeit* **2007**, 41, 306.
- [12] N. A. Ayoub, J. E. Garb, R. M. Tinghitella, M. A. Collin, C. Y. Hayashi, *PLoS One* **2007**, 2, e514.
- [13] M. Humenik, T. Scheibel, A. Smith, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, 103, 131.
- [14] P. A. Guerette, D. G. Ginzinger, B. H. Weber, J. M. Gosline, *Science* **1996**, 272, 112.
- [15] C. Y. Hayashi, T. A. Blackledge, R. V. Lewis, *Mol. Biol. Evol.* **2004**, 21, 1950.
- [16] A. H. Simmons, C. A. Michal, L. W. Jelinski, *Science* **1996**, 271, 84.
- [17] S. R. Fahnestock, S. L. Irwin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 23.
- [18] M. Heim, L. Roemer, T. Scheibel, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 156.
- [19] F. Hagn, L. Eisoldt, J. G. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel, H. Kessler, *Nature* **2010**, 465, 239.
- [20] F. Hagn, C. Thamm, T. Scheibel, H. Kessler, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 310.
- [21] G. Askarieh, M. Hedhammar, K. Nordling, A. Saenz, C. Casals, A. Rising, J. Johansson, S. D. Knight, *Nature* **2010**, 465, 236.
- [22] J. Bauer, D. Schaal, L. Eisoldt, K. Schweimer, S. Schwarzinger, T. Scheibel, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 34442.
- [23] L. Eisoldt, J. G. Hardy, M. Heim, T. R. Scheibel, *J. Struct. Biol.* **2010**, 170, 413.
- [24] L. R. Fox, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1975**, 6, 87.
- [25] D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, 43, 13604.
- [26] C. Vendrely, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 401.
- [27] J. A. Jones, T. I. Harris, C. L. Tucker, K. R. Berg, S. Y. Christy, B. A. Day, D. A. Gaztambide, N. J. C. Needham, A. L. Ruben, P. F. Oliveira, R. E. Decker, R. V. Lewis, *Biomacromolecules* **2015**, 16, 1418.
- [28] L. Han, L. Zhang, T. Zhao, Y. Wang, M. Nakagaki, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 56, 156.
- [29] C. Thamm, T. Scheibel, *Biomacromolecules* **2017**, 18, 1365.
- [30] D. P. Knight, L. Nash, X. W. Hu, J. Haffegge, M. W. Ho, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 41, 185.
- [31] H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos, *Biomaterials* **2003**, 24, 4353.
- [32] H. Yan, A. Saiani, J. E. Gough, A. F. Miller, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2776.
- [33] K. Schacht, T. Scheibel, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 2488.
- [34] S. Rammensee, D. Huemmerich, K. D. Hermanson, T. Scheibel, A. R. Bausch, *Appl. Phys. A* **2006**, 82, 261.
- [35] K. Schacht, T. Jungst, M. Schweinlin, A. Ewald, J. Groll, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2015**, 54, 2816.
- [36] C. Vepari, D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 991.
- [37] X. Hu, Q. Lu, L. Sun, P. Cebe, X. Wang, X. Zhang, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3178.
- [38] S. V. Murphy, A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 773.
- [39] S. Kapoor, S. C. Kundu, *Acta Biomater.* **2016**, 31, 17.
- [40] M. J. Rodriguez, J. Brown, J. Giordano, S. J. Lin, F. G. Omenetto, D. L. Kaplan, *Biomaterials* **2017**, 117, 105.
- [41] L. Sun, S. T. Parker, D. Syoji, X. Wang, J. A. Lewis, D. L. Kaplan, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 729.
- [42] R. Suntivich, I. Drachuk, R. Calabrese, D. L. Kaplan, V. V. Tsukruk, *Biomacromolecules* **2014**, 15, 1428.
- [43] U. J. Kim, J. Park, C. Li, H. J. Jin, R. Valluzzi, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 786.
- [44] V. A. Parsegian, R. P. Rand, N. L. Fuller, D. C. Rau, *Methods Enzymol.* **1986**, 127, 400.
- [45] X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Macromolecules* **2006**, 39, 6161.
- [46] K. Urayama, T. Takigawa, T. Masuda, *Macromolecules* **1993**, 26, 3092.
- [47] J. M. Zuidema, C. J. Rivet, R. J. Gilbert, F. A. Morrison, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2014**, 102, 1063.
- [48] E. L. Bakota, Y. Wang, F. R. Danesh, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 1651.
- [49] L. Li, B. Yan, J. Yang, L. Chen, H. Zeng, *Adv. Mater.* **2015**, 27, 1294.
- [50] D. Huemmerich, U. Slotta, T. Scheibel, *Appl. Phys. A* **2006**, 82, 219.
- [51] M. Humenik, M. Drechsler, T. Scheibel, *Nano Lett.* **2014**, 14, 3999.
- [52] A. Barth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, 74, 141.
- [53] U. Slotta, S. Hess, K. Spiess, T. Stromer, L. Serpell, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 183.
- [54] M. Groenning, *J. Chem. Biol.* **2010**, 3, 1.
- [55] M. Humenik, M. Magdeburg, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.* **2014**, 186, 431.
- [56] E. DeSimone, K. Schacht, T. Scheibel, *Mater. Lett.* **2016**, 183, 101.
- [57] A. Leal-Egana, T. Scheibel, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, 55, 155.
- [58] F. C. Mackintosh, J. Kas, P. A. Janmey, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, 75, 4425.
- [59] A. Martinez-Ruvalcaba, E. Chornet, D. Rodrigue, *Carbohydr. Polym.* **2007**, 67, 586.
- [60] T. Jungst, W. Smolan, K. Schacht, T. Scheibel, J. Groll, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 1496.



Supporting Information

for *Macromol. Biosci.*, DOI: 10.1002/mabi.201700141

Characterization of Hydrogels Made of a Novel Spider Silk Protein eMaSp1s and Evaluation for 3D Printing

Christopher Thamm, Elise DeSimone, and Thomas Scheibel*

Supporting Information

for *Macromol. Biosci.*, DOI: 10.1002/mabi.201700141

Characterization of hydrogels made of a novel spider silk protein eMaSp1s and evaluation for 3D printing

Christopher Thamm, Elise DeSimone and Thomas Scheibel*

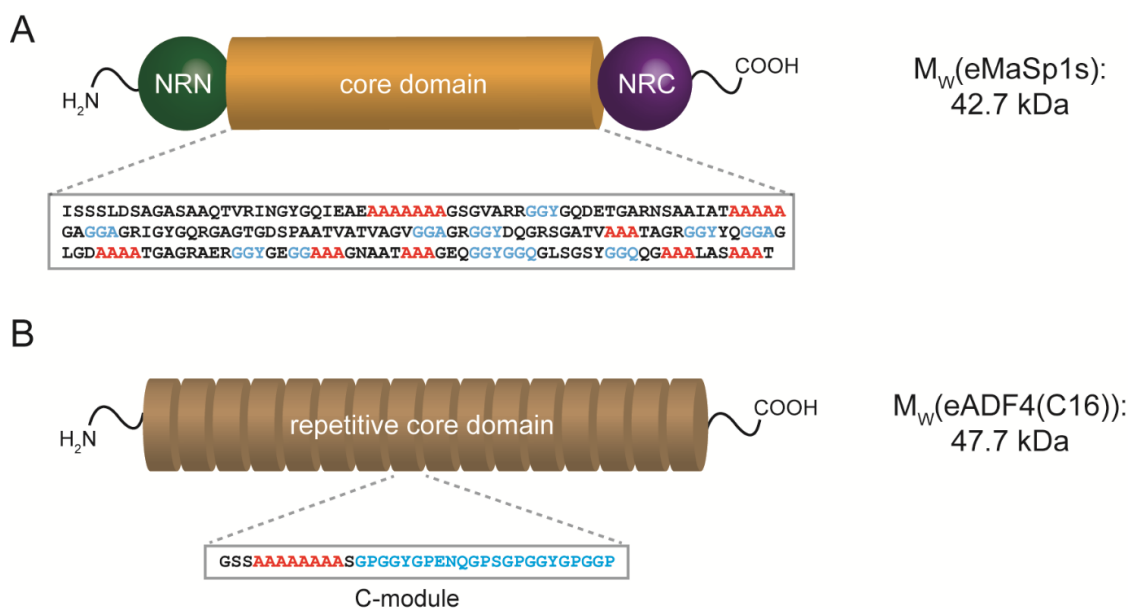


Figure S1: Scheme and sequence of eMaSp1s and eADF4(C16). Specific motifs are highlighted in red (poly-A) and blue (glycine-rich). The theoretical molecular weights (M_w) of both proteins were calculated using ProtParam tool: <http://web.expasy.org/protparam>.

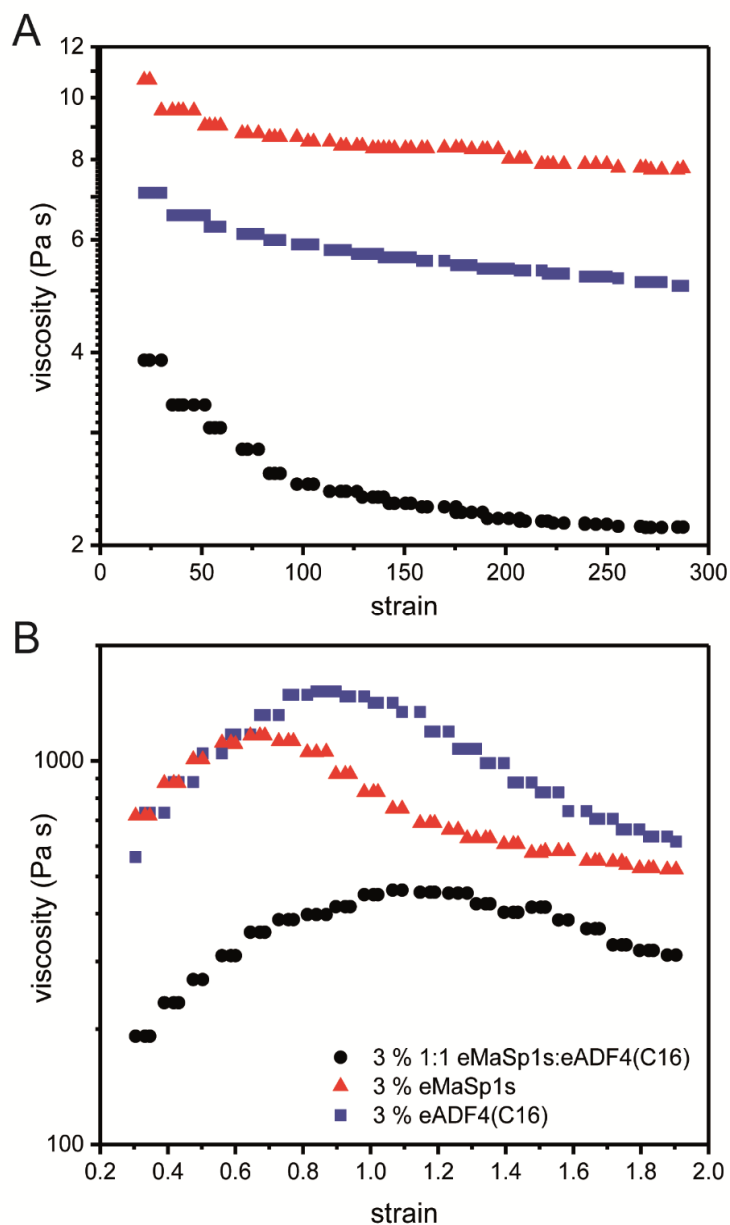


Figure S2: Viscosity measurements of hydrogels during the deformation phase at time sweep recovery measurements (see also figure 6). Hydrogels were either deformed at a shear rate of 40 s^{-1} for 1 second (A) or 0.2 s^{-1} for 10 seconds (B).

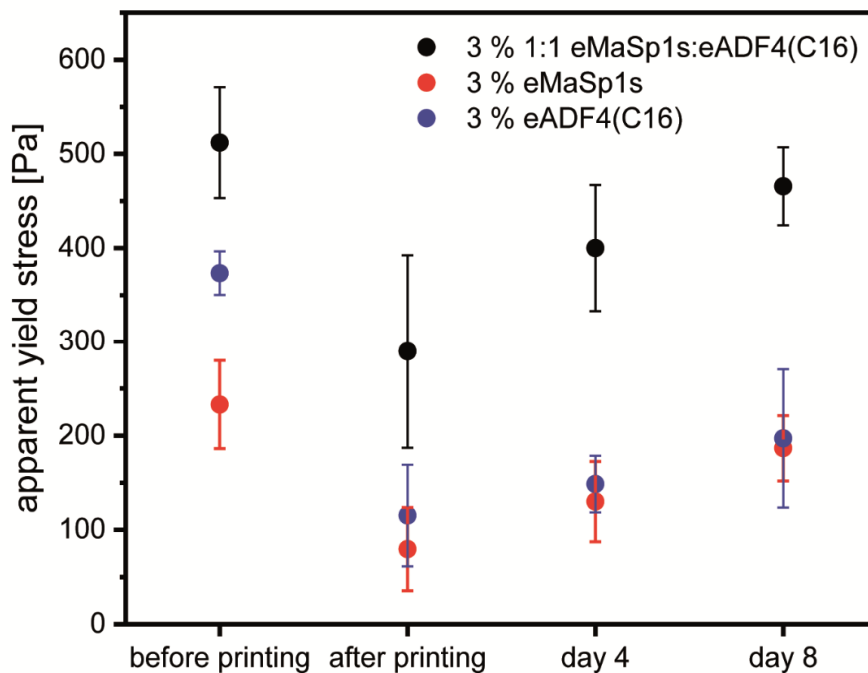


Figure S3: Changes in the apparent yield stress of 3 % (w/v) eMaSp1s, eADF4(C16) and blended hydrogels before printing, immediately after printing, 4 days after printing and 8 days after printing. Apparent yield stress was defined as the maximum stress experienced by the sample before yielding. Between measurements, hydrogels were stored at 4 °C and 100 % RH. Three samples were measured per group (n = 3).

Table S1: Secondary structure content of MaSp1s hydrogels and blended hydrogels with eADF4(C16) as determined by FSD of FTIR spectra.

	α -helices	β -sheets	β -turns	random coil	side chains
3 % (w/v) MaSp1s	21.7	26.6	16.7	33.6	1.5
7 % (w/v) MaSp1s	12.0	25.3	23.9	34.2	4.6
3 % (w/v) 1:1 eADF4(C16): eMaSp1s Blend	10.6	33.4	33.4	31.3	2.8

6.3. TEILARBEIT III

The Power of Recombinant Spider Silk Proteins

Wohlrab, S., Thamm, C. and Scheibel, T.

Veröffentlicht in: Asakura, Miller: Biotechnology of Silk, *Springer*, pp. 179-201.

2013

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

Chapter 10

The Power of Recombinant Spider Silk Proteins

Stefanie Wohlrab, Christopher Thamm, and Thomas Scheibel

Abstract Due to their outstanding mechanical properties, their biocompatibility and biodegradability spider silk fibers are of high interest for researchers. Silk fibers mainly comprise proteins, and in the past decades biotechnological methods have been developed to produce spider silk proteins recombinantly in varying hosts, which will be summarized in this review. Further, several processing techniques like biomimetic spinning, wet-spinning or electro-spinning applied to produce fibers and non-woven meshes will be highlighted. Finally, an overview on recent developments concerning genetic engineering and chemical modification of recombinant silk proteins will be given, outlining the potential provided by recombinant spider silk-chimeric proteins and spider silk-inspired polymers (combining synthetic polymers and spider silk peptides).

Keywords Recombinant spider silk proteins • Fibers • Genetic engineering • Chemical modification • Biopolymer

10.1 Introduction

Female orb weaving spiders such as *Nephila clavipes* and *Araneus diadematus* are able to produce up to seven different silk types for different applications, such as catching and wrapping prey, for protecting their offspring etc. Spider silks are mainly made of silk proteins (spidroins) and they are named after the glands the proteins are produced in. The best characterized silk is the Major Ampullate (MA)

S. Wohlrab • C. Thamm • T. Scheibel (✉)
Department of Biomaterials, University of Bayreuth, Universitätsstr. 30,
95440 Bayreuth, Germany
e-mail: Thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

silk (also known as dragline silk). In order to analyze the properties of spider silk as well as to use them in distinct applications, sufficient quantities of the material are necessary.

Unfortunately, due to their cannibalistic behavior it is not possible to farm spiders. Further, collecting silk from individual spiders is time consuming and not very effective. Therefore, silk genes have been transferred from spiders to other host organisms to produce recombinant spider silk proteins. Besides employing cDNA, engineered silk genes have been utilized encoding proteins which are comparable to the natural ones concerning their amino acid sequence.

Here, we summarize efforts to recombinantly produce spider silk proteins in bacteria and highlight the possibilities of their application-driven modification, as well as the techniques of processing them into fibers.

10.2 Recombinant Production of Dragline Silk Proteins

Dragline silk comprises spidroins produced in the major ampullate gland and is used e.g. as the frame and the radii of an orb web, and also as the spider's lifeline. In comparison to most man-made fibers like Kevlar or carbon fibers, dragline silk has superior mechanical properties especially concerning its toughness (Heim et al. 2009; Gosline et al. 1999). Two major ampullate spidroin classes can be defined named MaSp 1 and MaSp 2, which mainly differ in proline content (MaSp1 shows no or little proline residues, while MaSp2 is enriched in proline residues). Furthermore, MaSp1 tends to be more hydrophobic than MaSp2. The molecular setup of MaSp proteins is given in Fig. 10.1 showing exemplarily the MaSp2 protein ADF4 of *Araneus diadematus*.

Major ampullate spidroin monomers have a molecular weight of up to 350 kDa (Ayoub et al. 2007; Sponner et al. 2004). Despite of their different functions,

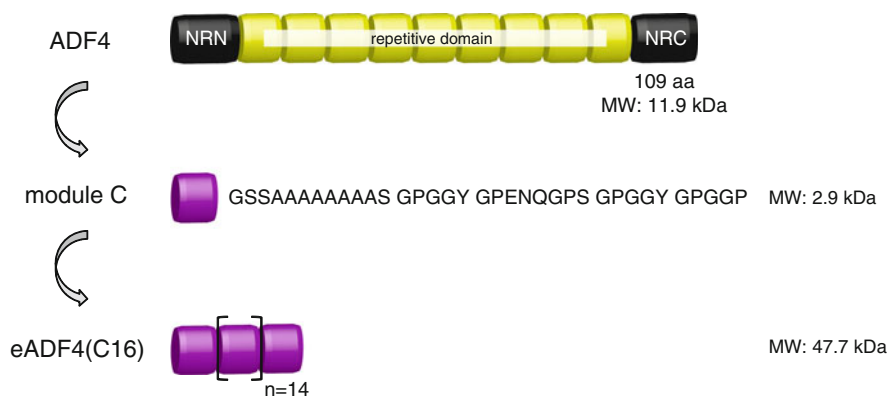


Fig. 10.1 Molecular setup of the recombinant protein eADF4 (C16) (engineered ADF4). A consensus repeat motif (Module C) is derived from the repetitive core of the dragline protein ADF4. By reverse translation, synthetic oligonucleotides can be produced and seamlessly cloned

spidroins comprise a highly repetitive core sequence, flanked by non-repetitive termini (Scheibel 2004; Eisoldt et al. 2011). The core domain accounts for approximately 90 % of the protein's sequence and consists of repeating motifs, each formed by 30–150 amino acids which can be repeated up to 100 times in a single spidroin (Hayashi et al. 2004; Guerette et al. 1996).

While the repetitive core domain of a spider silk protein is important for its macromolecular properties, the non-repetitive termini play a key-role in storage and assembly. Compared to the core domain, the carboxy (NRC)- and aminoterminal (NRN) domains are highly conserved for each silk type throughout different species or sometimes even between different silk types (Motriuk-Smith et al. 2005; Rising et al. 2006; Garb et al. 2010), indicating their highly important function. Both terminal domains of MaSp form five-helix bundles (Hagn et al. 2010, 2011; Askarieh et al. 2010). The recently studied NRN domains of *Latrodectus hesperus* and *Euprosthenops australis* are monomeric at pH above 6.8 and dimerize in an antiparallel fashion upon slight acidification. In comparison to the aminoterminal domains, the NRC domain of *Araneus diadematus* is a disulphide-linked, parallel dimer with one of the five helices being domain swapped. Importantly, all solution structures were solved using recombinantly produced proteins.

First attempts to produce recombinant spider silk proteins by using cDNA from spiders revealed several problems. Bacterial hosts such as *E. coli* have a different codon usage than spiders lowering the protein yield. Further repetitive sequences are often removed in bacteria by homologous recombination creating a polydisperse set of proteins with different molecular weight (Xu and Lewis 1990; Arcidiacono et al. 1998). Likewise, the efforts to express silk genes in eukaryotic cells were not successful or yielded low protein amounts (Menassa et al. 2004; Lazaris et al. 2002). A short overview on different host organisms used for recombinant spider silk protein production is shown in Table 10.1.

A more promising approach is the recombinant production of engineered spider silk spidroins with adapted DNA sequences. Based on the repetitive core sequence of spider silk spidroins, it is easy to design optimized genes by simple cloning techniques (Lawrence et al. 2004; Colgin and Lewis 1998; Huemmerich et al. 2004a; Lewis et al. 1996; Prince et al. 1995; Vendrely et al. 2008). An overview on recent attempts is shown in Table 10.2.

10.3 Processing of Recombinant Spider Silk Proteins

Spider silk proteins can be processed into fibers, capsules, particles, hydrogels, foams, films or non-woven meshes (Schacht and Scheibel 2011; Spiess et al. 2010; Leal-Egana et al. 2012; Hardy et al. 2008). Assembly of the recombinant spidroins can be triggered by protein concentration, pH, temperature, ionic strength or mechanical stress, among others.

Here we will focus on processing of recombinant spider silk proteins into fibers and non-woven meshes.

Table 10.1 Host organisms used for expressing spider cDNA and cDNA fragments

Host organism	DNA origin	MW [kDa] of the protein	Silk type	References
Prokaryotes				
<i>E. coli</i>	<i>N. clavipes</i>	43	MaSp1	Arcidiacono et al. (1998)
<i>E. coli</i>	<i>N. clavipes</i>	12	MaSp1 & MaSp2	Sponner et al. (2005)
<i>E. coli</i>	<i>N. antipodiana</i>	12–15	TuSp1	Lin et al. (2009)
<i>E. coli</i>	<i>E. australis</i>	10–28	MaSp1	Askarieh et al. (2010), Hedhammar et al. (2008), and Stark et al. (2007)
<i>E. coli</i>	<i>L. hesperus</i>	N/A	PySp2	Geurts et al. (2010)
<i>E. coli</i>	<i>L. hesperus</i>	33, 45	TuSp1	Gnesa et al. (2012)
Eukaryotes				
Insect cells (<i>S. fruiiperda</i>)	<i>A. diadematus</i>	35–56	ADF3 & ADF4	Huemmerich et al. (2004b)
Insect cells (<i>S. fruiiperda</i>)	<i>A. diadematus</i>	50–105	ADF3 & ADF4	Ittah et al. (2006)
Insect cells (<i>S. fruiiperda</i>)	<i>A. ventricosus</i>	28	Flag	Lee et al. (2007)
Insect cells (<i>S. fruiiperda</i>)	<i>A. ventricosus</i>	61	Polyhedron-Flag fusion protein	Lee et al. (2007)
Mammalian cells (MAC-T & BHK)	<i>N. clavipes</i>	12	MaSp1 & MaSp2	Lazaris et al. (2002)
Mammalian cells (MAC-T & BHK)	<i>A. diadematus</i>	60–140	ADF3	Lazaris et al. (2002)
Mammalian cells (COS-1)	<i>Euprostenops</i> sp.	22, 25	MaSp1	Grip et al. (2006)
Transgenic animals (goats)	<i>A. diadematus</i>	60	ADF3	Karatzas et al. (1999)
Transgenic animals (mice)	<i>N. clavipes</i>	31–66	MaSp1 & MaSp2	Xu et al. (2007)
Transgenic animals (<i>B. mori</i>)	<i>N. clavipes</i>	83	MaSp1	Wen et al. (2010)
Yeast (<i>P. pastoris</i>)	<i>N. clavipes</i>	33–39	MaSp1 & MaSp2	Teulé et al. (2003)
Yeast (<i>P. pastoris</i>)	<i>N. clavipes</i>	57–61	ADF3	Teulé et al. (2003)

MaSp major ampullate spidroin, *ADF* *Araneus diadematus* fibroin, *MAC-T* bovine mammary alveolar cells, *BHK* baby hamster kidney cells, *COS* fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue, *Flag* flagelliform, *TuSp* tubiliform spidroin, *PySp* pyriform spidroin, *MW* molecular weight

Table 10.2 Engineered spider silk proteins produced in different bacterial hosts

Silk type	Origin	MW [kDa] of the protein	Host organism	References
MaSp1	<i>L. hesperus</i>	N/A	<i>S. typhimurium</i>	Widmaier et al. (2009) and Widmaier and Voigt (2010)
	<i>N. clavipes</i>	100–285	<i>E. coli</i>	Xia et al. (2010)
	<i>N. clavipes</i>	15–26	<i>E. coli</i>	Winkler et al. (1999) and Szela et al. (2000)
	<i>N. clavipes</i>	45–60	<i>E. coli</i>	Huang et al. (2007), Wong Po Foo et al. (2006), and Bini et al. (2006)
	<i>N. clavipes</i>	10–20	<i>E. coli</i>	Fukushima (1998)
MaSp2	<i>A. aurantia</i>	63–71	<i>E. coli</i>	Brooks et al. (2008b) and Teulé et al. (2009)
	N/A	31–112	<i>E. coli</i>	Lewis et al. (1996)
MaSp2/Flag	<i>N. clavipes</i>	58, 62	<i>E. coli</i>	Teulé et al. (2007)
MaSp1 & MaSp2	<i>L. hesperus</i>	14	<i>E. coli</i>	Hagn et al. (2011)
	<i>N. clavipes</i>	20–56	<i>E. coli</i>	Arcidiacono et al. (2002) and Mello et al. (2004)
	<i>N. clavipes</i>	N/A	<i>B. subtilis</i>	Fahnestock (1994)
	<i>N. clavipes</i>	55, 67	<i>E. coli</i>	Brooks et al. (2008a)
	<i>N. clavipes</i>	15–41	<i>E. coli</i>	Prince et al. (1995)
	<i>N. clavipes</i>	65–163	<i>E. coli</i>	Fahnestock and Irwin (1997)
	<i>A. diadematus</i>	34–106	<i>E. coli</i>	Schmidt et al. (2007) and Huemmerich et al. (2004a)
ADF3, ADF4	<i>A. diadematus</i>	25–56	<i>S. typhimurium</i>	Widmaier et al. (2009) and Widmaier and Voigt (2010)
ADF1- ADF4	<i>N. clavipes</i>	N/A	<i>S. typhimurium</i>	Widmaier et al. (2009) and Widmaier and Voigt (2010)
Flag	<i>N. clavipes</i>	14–94	<i>E. coli</i>	Heim et al. (2010) and Vendrely et al. (2008)
	<i>N. clavipes</i>	25	<i>E. coli</i>	Zhou et al. (2001)

10.3.1 Fibers

In principle, several techniques can be applied to produce fibers from solutions of recombinant spider silk proteins. Here a short overview on recent attempts of two prominent techniques, namely wet spinning and biomimetic spinning will be given.

10.3.1.1 Wet Spinning

In wet spinning processes, polymer or protein solutions are extruded into a coagulation bath. The proteins, dissolved in aqueous solution or organic solvents are extruded into water, methanol, isopropanol or acetone (Seidel et al. 1998; Hardy et al. 2008). An overview of approaches to wet-spin recombinant spider silk proteins as well as mechanical properties of the achieved fibers are given in Table 10.3.

Table 10.3 Wet spun fibers from recombinant spider silk protein

Silk types	Origin	MW [kDa] of the protein	Mechanical properties			References
			Tensile strength [MPa]	Elasticity [%]		
Flag, MaSp like fusion proteins	<i>N. clavipes</i>	58	28.6 ± 17.2	3.7 ± 1.2		Teulé et al. (2007)
MaSp1, Ma Spidroin 1 + 2	<i>N. clavipes</i>	62	10.2 ± 7.3	1.6 ± 1.0		Teulé et al. (2007)
		43, 55	–	–		Arcidiacono et al. (2002)
MaSp2	<i>A. aurantia</i>	63	6.6 ± 5.1	1.5 ± 0.3		Brooks et al. (2008b)
		67	1.9 ± 2.4	19.0 ± 2.2		Brooks et al. (2008b)
		71	49.5 ± 7.8	3.6 ± 2.6		Brooks et al. (2008b)
ADF3	<i>A. diadematus</i>	60–140	–	43.4 – 59.6		Lazaris et al. (2002)
ADF3	<i>A. diadematus</i>	106.3	64.6 ± 26.0	10.8 ± 3.1		Keerl and Scheibel (2012)
MaSp1, MaSp2	<i>N. clavipes</i>	59–106	–	–		Lazaris et al. (2002)
MaSp2	<i>N. clavipes</i>	31–112	–	–		Lewis et al. (1996)
Ma Spidroin 1 analogs	<i>N. clavipes</i>	94	100.0 – 150.0	5.0 – 15.0		Bogush et al. (2009)
Ma Spidroin 2 analogs	<i>N. madagascariensis</i>	113	100.0 – 150.0	5.0 – 15.0		Bogush et al. (2009)
Ma Spidron 1 like fusion proteins	<i>N. clavipes</i>	64–126	–	–		Yang et al. (2005))
MaSp1	<i>N. clavipes</i>	100–284	508.0 ± 108.0	15.0 ± 5.0		Xia et al. (2010)
MaSp1	<i>N. clavipes</i>	46	16.3 ± 6.7	1.5 ± 0.4		An et al. (2011)
		70	35.7 ± 8.4	3.1 ± 1.8		An et al. (2011)
MaSp2, Flag	<i>N. clavipes</i>	58	28.4 ± 25.4	1.7 ± 0.6		Teulé et al. (2011)
MaSp1, MaSp2 inspired protein	<i>N. clavipes</i>	50	280.0 – 350.0	27.0 – 42.0		Elices et al. (2011)

The majority of the recombinant fibers have been made of MaSp1 and MaSp2 derivatives from *Nephila clavipes*. The molecular weight of the underlying proteins varied from 31 to 284 kDa with some tendency, but no strict relation between the molecular weight and tensile strength. Evidently, both the tensile strength and elasticity differed between fibers made of different recombinant spider silk proteins for reasons of molecular weight, but also protein sequence, concentration of the spinning solution, fiber diameter and the coagulation bath. There are also large deviations in the mechanical properties of the different fibers investigated in individual spinning approaches, as seen in Table 10.3. Such variability makes it hardly possible to exactly predict the fiber's properties before spinning based on the amino acid sequence and/or the molecular weight. In principle the tensile strength of a fiber rises with decreasing diameter (Teulé et al. 2011) and increasing molecular weight of the protein (Xia et al. 2010), reaching a plateau above a specific protein size. Importantly, if compared to the mechanical properties of natural spider silk fibers, all man-made fibers show less mechanical stability, independent of the fiber diameter (Seidel et al. 2000). The reason for this finding could be related to molecular self-assembly of the spidroins. Therefore, a detailed analysis of this assembly is necessary, which is one basis of biomimetic spinning.

10.3.1.2 Biomimetic Spinning

Biomimetic spinning implements all factors that are important in the natural spinning process including molecular self-assembly of the spidroins. The main factors needed for a transition of a soluble state of the spidroins in the spinning dope into a solid fiber during natural spinning are a change in pH, ion exchange and internal water removal. In addition to chemical processes, extensional and shear forces in the duct are necessary to solidify the fiber (Fig. 10.2). Under storage conditions at pH 7, spidroins form micellar-like structures with liquid-crystalline properties to prevent aggregation (Knight and Vollrath 1999; Hu et al. 2007), whereby the terminal domains play a key role (Askarieh et al. 2010; Exler et al. 2007). Along the spinning duct the pH drops from around 7.4 to 6 and shear forces increase. Studies showed, that recombinant spidroins with NRC domains assemble into fibers while recombinant proteins without NRC domains only unspecifically aggregate (Hagn et al. 2010; Eisoldt et al. 2010; Rammensee et al. 2008). Further, the NRC domain has been shown to be important for pre-orientation of the core domains structure (Askarieh et al. 2010; Exler et al. 2007; Eisoldt et al. 2010).

Such knowledge has been used to develop microfluidic devices mimicking the geometry of silk glands, and which allowed controlling the chemical and mechanical parameters necessary to produce silk fibers.

Rammensee et al. presented a microfluidic device which allowed to assemble recombinant spidroins in aqueous solution using solely the natural triggers (Rammensee et al. 2008). Next generation microfluidic devices allowed to produce functional spider silk fibers with predictable diameter (Kinahan et al. 2011).

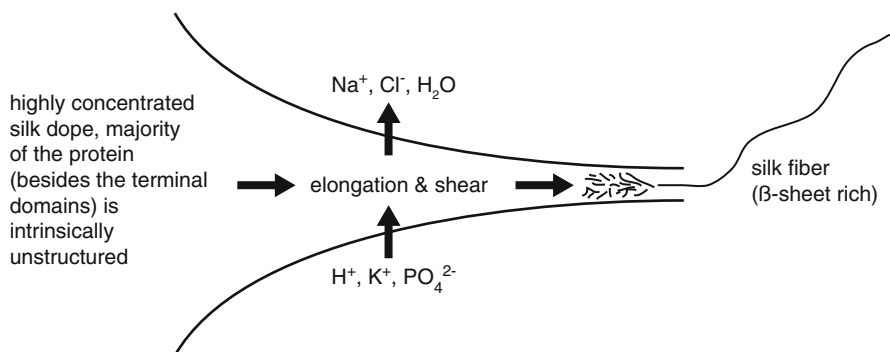


Fig. 10.2 Schematic overview of the parameters critical for the natural spinning process of spider dragline silk. During this process, the pH is lowered and phosphate and potassium ions are pumped into the silk dope, while water and chloride are extracted from the dope. Mechanical stress induces the formation of a silk fiber with high β -sheet content

The fiber diameter can be controlled by the flow rate of the protein solution within the microfluidic channel. The velocity along the silk gland of spiders rises due to a steady decrease in radius (Breslauer et al. 2009). Different spinning speeds have also a significant effect on the properties of the resulting fibers (Vollrath et al. 2001), likely because of higher molecular alignment caused by stretching of the fiber. *In vitro*, higher flow rates than in natural processes are needed based on less concentrated protein solutions in comparison to nature where increased concentration and thereby viscosity leads to fiber formation at lower elongational flow rates (Rammensee et al. 2008). Although microfluidic devices provide a simple method to produce uniformly sized fibers, there are still problems to produce endless and consistent fibers with properties similar to that of the natural blueprint.

10.3.2 Non-woven Meshes Made of Recombinant Spider Silk Proteins

Electrospinning of biopolymers is a cost effective and easy way to produce non-woven meshes with high inter-fiber spacing and fiber diameters ranging from micrometers down to a few nanometers (Frenot and Chronakis 2003). The advantage of electrospinning is the low amount of polymer solution needed to generate continuous fibers (Baumgarten 1971). If an electric field is applied to a pendant droplet of polymer solution a Taylor cone is formed, and a polymer jet is created directing towards the counter electrode. The solvent evaporates before reaching the collector plate, and dried fibers can be collected e.g. as a non-woven mat (Huang et al. 2003). The fiber diameter can be controlled by the viscosity, the concentration of the polymer solution, the salt content, the surface tension of the solvent, the distance to the counter electrode, as well as the polymer itself

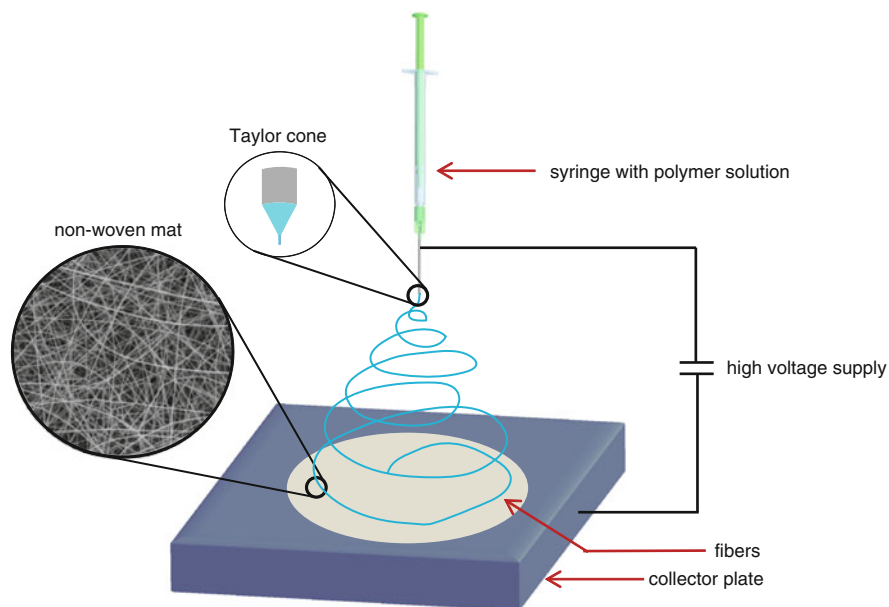


Fig. 10.3 Scheme of an electrospinning setup. An electric field is applied to a pendant droplet of polymer solution leading to a Taylor cone, from which a polymer jet emerges. The solvent evaporates before reaching the collector plate, and dried fibers can be collected e.g. as a non-woven mat (Huang et al. 2003)

(molecular weight, molecular weight distribution, solubility, and glass transition temperature) (Heikkilä and Harlin 2008; Greiner and Wendorff 2007). Furthermore, the surrounding temperature and the relative humidity can significantly influence fiber formation (Fig. 10.3).

To guarantee the continuity of the fibers, the concentration of the silk solution must be high enough to permit the entanglement between the silk molecules. Interaction between the solvent and the silk molecules, as well as their molecular weight, will influence the minimal concentration needed (Chengjie et al. 2009). Depending on the collector set up, single fibers or non-woven meshes can be achieved, the later showing a high surface area to volume ratio and a high potential for applications in e.g. tissue engineering and wound healing.

Several groups have electrospun different silk types, including regenerated *B. mori* silk, regenerated *N. clavipes* dragline silk and silk-like polymers from organic solvents like formic acid (FA), Hexafluoroisopropanol (HFIP) or Hexafluoroacetone (HFA) (Buchko et al. 1999; Jin et al. 2002; Zarkoob et al. 2004). Only a few electrospinning setups employed recombinant spider silk proteins as depicted below.

The recombinant spider silk protein eADF4(C16) (based on the dragline silk protein ADF4 of *A. diadematus*) was dissolved in HFIP at concentrations from 4 % (w/v) to 24 % (w/v). Below 8 % (w/v) nanoparticles were obtained (akin to electro-

spraying), while homogeneous fibers could only be produced at concentrations above 16 % (w/v). With increasing protein concentration the fibers diameter increased from 150 to 700 nm (Leal-Egana et al. 2012). All as-spun eADF4(C16) fibers from HFIP were water soluble and predominantly consisted of random coil and α -helical structures. Since in most applications water stable fibers are necessary, the non-woven meshes can be post-treated with methanol vapor to induce the formation of β -sheet structures (Leal-Egana et al. 2012; Lang et al. 2013). Another way to promote β -sheet formation in non-woven meshes is temperature or humidity annealing (Wang et al. 2006; Zarkoob et al. 2004).

Cell culture experiments with BALB/3T3 mouse fibroblasts on post-treated eADF4(C16) non-woven meshes showed that cell adhesion and proliferation were strictly dependent on the diameter of the individual fibers. With increasing fiber diameter cells adhere much better to the meshes, and their doubling time decreases while their proliferation rate increases. One explanation for this phenomena is that the larger the fiber diameter, the larger the spacing between the fibers, making it easier for lamellipodia and filopodia to protrude (Leal-Egana et al. 2012).

Bini et al. created two engineered proteins based on the consensus sequence derived from MaSp 1 of *Nephila clavipes*. One of the proteins was further fused with an RGD motif to enhance cell interactions. Non-woven meshes comprising these proteins were spun from HFIP solutions, and the obtained fiber diameters ranged from 50 to 250 nm with an average diameter of 100 nm. To increase the β -sheet content non-woven meshes were post-treated with methanol (Bini et al. 2006) (cf. Sect. 10.4.1).

To generate organic–inorganic composite non-woven scaffolds, an R5 peptide (derived from the repetitive motif of silaffin proteins) was fused to *N. clavipes* spider dragline silk protein, either in presence or absence of an additional RGD motif (Foo et al. 2006). Fibers of the chimeric spider silk-silaffin proteins were spun from HFIP. Incubation of these non-woven meshes with silicic acid solution induced silica sphere formation on the non-woven mats with diameters ranging from 200 to 400 nm. Since the non-woven meshes were not post-treated, the fibers fused upon incubation in silicic acid. Contrarily, when non-woven meshes were treated with methanol before silification, silica nanospheres were sparsely observed. Silification reactions during electrospinning (concurrent processing) resulted in a non-uniform coating of the fibers but no particle formation (Foo et al. 2006).

10.4 Modification of Recombinant Silk Proteins

One advantage of recombinant spider silk proteins is the ease of genetic modification which allows the direct incorporation of functional groups into the silk proteins (as already depicted in some examples in Sect. 10.3.) Alternatively, chemical modification of distinct naturally occurring or artificially introduced specific amino acid side chains is feasible.

Table 10.4 Chimeric spider silk proteins for diverse biomedical applications

Fusion protein	Application	References
Silk + silicifying peptides	Scaffolds for bone regeneration	Foo et al. (2006), Mieszawska et al. (2010), and Belton et al. (2012)
Silk + dentin matrix protein	Scaffolds for bone regeneration	Huang et al. (2007)
Silk + RGD peptides	Biomedical applications	Bini et al. (2006), Morgan et al. (2008), Wohlrab et al. (2012), and Bauer et al. (2013)
Silk + poly(L-lysine)	Drug delivery	Numata et al. (2009, 2012)
Silk + poly(L-lysine) + cell penetrating peptide	Drug delivery	Numata and Kaplan (2010)
Silk + antimicrobial domain	Tissue engineering	Currie et al. (2011) and Gomes et al. (2011)

10.4.1 Genetic Engineering

Genetic engineering of silk genes allows to incorporate either individual amino acids, or even peptide sequences that enable enhanced cell adhesion or improved solubility (Table 10.4). In the following, several attempts to modify silk proteins for specific applications are summarized.

10.4.1.1 Biomineralisation

Biosilica architectures in diatoms are produced under ambient conditions (aqueous solution, neutral pH and low temperatures). *In vitro*, the R5 peptide (derived from the repetitive motif of the silaffin protein of *Cylindrotheca fusiformis*) regulates and induces silica formation under similar conditions. To generate scaffolds for bone regeneration, the R5 sequence was genetically fused to an RGD containing *N. clavipes* spider dragline silk protein (as mentioned in Sect. 10.3.) (Foo et al. 2006). Besides fibers, the resulting chimeric silk-silica proteins were processed into films. By treating such films with silicic acid solution, the R5 peptide induces biomineralization on the surface (Foo et al. 2006). Osteogenic differentiation was analyzed culturing human mesenchymal stem cells (hMSCs) on such silk-silica protein films. The bound silica influenced osteogenic gene expression with upregulation of alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), and collagen type 1 (Col 1). Calcium deposits on silk-silica films further indicated enhanced osteogenesis (Mieszawska et al. 2010).

Belton et al. determined the silica condensation using a range of silicifying peptides (R5: SSKKSGSYSGSKGSKRRIL; A1: SGSKGSKRRIL; Si4-1: MSPH-PHPRHHHT, and repeats thereof) fused to the N-terminus of a recombinant *N. clavipes* spider dragline silk protein. The authors determined a strict relationship

between silk solution properties (e.g. pH of the solution) and silica deposition, leading to silica silk chimera material formation (Belton et al. 2012).

Another approach for using silk scaffolds in bone formation was investigated by Huang et al., producing a chimeric protein based on the MaSp1 of *N. clavipes* and dentin matrix protein 1 which is involved in the nucleation and crystallization of hydroxyapatite. The recombinantly produced protein was processed into films, which showed no structural differences in comparison to films of non-modified silk. Incubation of processed films in simulated body fluids induced the growth of hydroxyapatite crystals on silk films with the fused dentin matrix protein 1, indicating their potential for applications in bone tissue engineering (Huang et al. 2007).

10.4.1.2 Cell Adhesion

For biomedical applications the interaction of a material's surface with cells or tissue is highly important. One strategy to improve cell adhesion is to change the surface topography of a material (Leal-Egana et al. 2012; Leal-Egana and Scheibel 2012; Bauer et al. 2013). Another one is modification of the silk proteins with cell adhesive peptides. The recombinant spider silk protein eADF4(C16) was genetically modified with the linear cell adhesion sequence GRGDSPG. The RGD-modified protein was successfully processed into films, and cell adhesion and proliferation of mouse fibroblasts (BALB/3T3) was investigated thereon. In comparison to unmodified spider silk films, cells on RGD-modified films showed improved adhesion and proliferation (Wohlrab et al. 2012).

Bini et al. combined the consensus sequence derived from MaSp1 of *N. clavipes* with the cell binding motif RGD. The modified silk was processed into films and fibers, which were successfully used for culturing human bone marrow stromal cells (hMSCs). In comparison to the tissue culture plastic, silk surfaces showed increased calcium deposition, but surprisingly no impact on cell differentiation was observed (Bini et al. 2006). Since cell binding is dependent on the surface density of RGD, Morgan et al. blended RGD modified recombinant spidroin with *B. mori* silk in different ratios (10:90, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10 RGD-spidroin: silk fibroin) to adjust the RGD concentration exposed on the silk film surface. Strikingly, the proliferation and differentiation of pre-osteoblasts (MC3T3-E1) was indistinguishable between the various blends (Morgan et al. 2008).

10.4.1.3 Gene Delivery

Engineered block copolymers of spider silk with poly(L-lysine) domains were investigated as gene delivery systems. The silk-poly(L-lysine) copolymer self-assembles into complexes with plasmid DNA (pDNA) through electrostatic interactions. The resulting particles delivered genes into human embryonic kidney cells (HEK) (Numata et al. 2009). To increase the delivery efficiency, incorporation of

cell penetrating peptides (CPPs), like ppTG1, into silk hybrids was investigated. CPPs which are known to be amphipathic and positively charged (Zorko and Langel 2005) are able to deliver large-cargo molecules into cells (Madani et al. 2011). Complexes of the silk-poly(L-lysine)-ppTG1 protein with pDNA showed a transfection efficiency comparable to the transfection reagent Lipofectamine 2000 (Numata and Kaplan 2010). In another study the tumor-homing peptide (THP) was fused to a silk-poly(L-lysine) block copolymer. The pDNA complex of silk-poly(L-lysine)-THP block copolymers showed a significantly enhanced targeting of specific tumor cells (Numata et al. 2011, 2012).

10.4.1.4 Antimicrobial Silk

Silver containing silk materials could be used in applications in which antimicrobial activity is needed. Therefore, Currie et al. fused a silver binding peptide to a recombinant spider dragline silk protein derived from MaSp1 of *N. clavipes*. The resulting protein nucleated Ag ions from a silver nitrate solution (Currie et al. 2011). Regarding antimicrobial activity, Gomes et al. fused the consensus sequence derived from the MaSp1 of *N. clavipes* with three different antimicrobial peptides (the human antimicrobial peptides human neutrophil defensin 2 (HNP-2), human neutrophil defensin 4 (HNP-4) and hepcidin). The recombinantly produced chimeric proteins were processed into films, and it was demonstrated that the silk domain retained its self-assembly properties. The antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* was analyzed, and the microbial activity was demonstrated. Furthermore, cell studies with a human osteosarcoma cell line (SaOs-2) demonstrated the compatibility of these films with mammalian cells (Gomes et al. 2011).

10.4.1.5 Others

To control the solubility of spider silk proteins Winkler et al. incorporated methionine residues next to polyalanine sequences, found in the dragline silk of *N. clavipes*, to trigger β -sheet formation. This methionine residues can work as redox triggers (Winkler et al. 1999). The oxidation to the sulfoxide state with phenacyl bromide yields a water-soluble protein and prevents the formation of β -sheets by disrupting the hydrophobic interactions between the overlaying sheets. Reduction with β -mercaptoethanol, in contrast, triggers self-assembly into β -sheets, without disturbing the general macromolecular assembly behavior (Valluzzi et al. 1999; Szela et al. 2000).

To control the β -sheet content, enzymatic phosphorylation and dephosphorylation reactions were performed with genetically engineered spider dragline silk proteins. By introducing charged phosphate groups using cyclic AMP-dependent protein kinase, hydrophobic interactions between the β -sheets were prevented, and thus solubility of the proteins increased. Concomitantly, dephosphorylation with calf intestinal alkaline phosphatase induced self-assembly and β -sheet formation (Winkler et al. 2000).

In addition to functional peptide sequences, individual amino acid residues with chemically specific side chains (such as thiols of cysteine residues) can be incorporated in engineered spider silk proteins. Due to the fact that thiol side chains of cysteines are ideally suited for modifications at neutral pH, a single cysteine was introduced in eADF4(C16) (Spiess et al. 2010). In comparison to the cysteine free variant, no differences concerning protein structure or assembly were detectable in solution and in the films. It could be shown that target molecules like maleimide-conjugated fluorescein were successfully coupled to the cysteine-modified silk proteins in processed films as well as in solution.

10.4.2 Chemical Functionalization

Chemical modification of silk proteins is an alternative route towards the functionalization of silk materials. Due to the fact that most chemical reactions occur in the presence of other functional groups, there must be a high selectivity thereof. Further, the coupling should in the best case take place at physiological conditions (Sletten and Bertozzi 2009). The functionalization of silk proteins is often much easier than that of globular proteins, since silk proteins are mostly intrinsically unfolded in aqueous solution. Typically, modifications of amino acid side chains are achieved by modifications using electrophilic or nucleophilic groups (Carrico 2008). Most recombinantly produced spidroins comprise non-reactive glycine and alanine residues and lack amino acids residues with functional groups like lysines or cysteines. Nevertheless glutamic acid, aspartic acid as well as tyrosine residues allow specific chemical modifications of spidroins (Vendrey and Scheibel 2007).

Modification of recombinant spider silk proteins is possible in solution and after processing into different morphologies (Fig. 10.4a). For example small organic molecules as well as biological macromolecules like enzymes can be immobilized on eADF4(C16) films by modification of glutamic acid residues. After activation of the carboxyl groups (one per repetitive unit in addition to the C-terminus) with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide (EDC/NHS), the enzyme β -galactosidase was efficiently coupled (Huemmerich et al. 2006). The activity of the enzyme after coupling was demonstrated using the specific substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal). Employing an ethylenediamine linker after EDC/NHS activation allowed coupling of fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) to the eADF4(C16) film's surface.

To create a single chemical bond between the recombinant spider silk protein eADF4(C16) and a target, one way is the modification of the N-terminus (since eADF4(C16) does not contain any other primary amines) (Schacht and Scheibel 2011). The one-step reaction of N-hydroxysuccinimide (NHS)-activated carboxylic acid targets with primary amines is, however, limited by a low specificity (Thordarson et al. 2006). Due to the fact that thiol side chains of cysteine residues are ideally suited for modifications at neutral pH, a single cysteine residue was introduced in eADF4(C16) (Spiess et al. 2010) (Fig. 10.4b, see also Sect. 10.4.1.5).

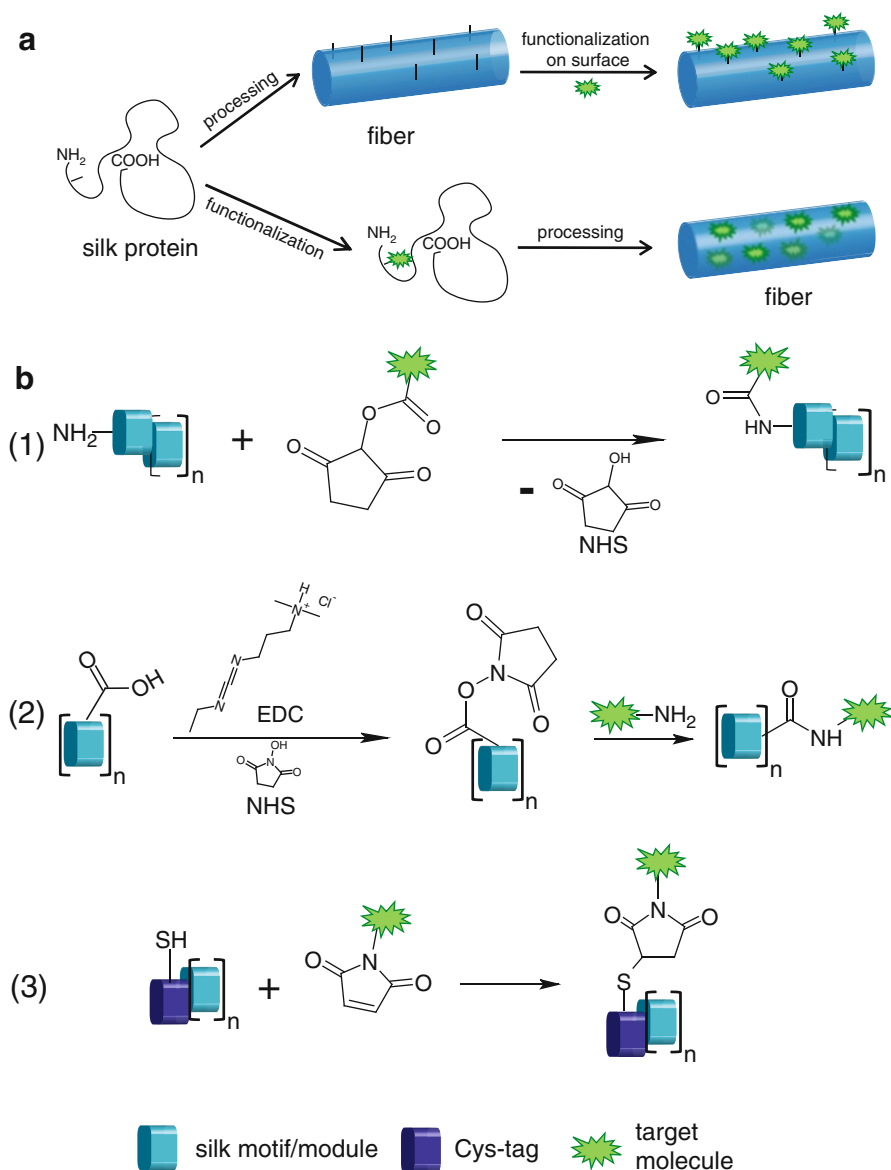


Fig. 10.4 Chemical modification of engineered spider silk proteins; **(a)** Two routes of functionalization of silk fibers can be achieved: processing of the fibers followed by chemical modification or chemical functionalization in aqueous solution followed by fiber production; **(b)** Modification of recombinant silk proteins with N-hydroxysuccinimide (NHS)-activated carboxylic acid targets at primary amines (1) or functionalization of terminal carboxyl groups and glutamic acid residues with EDC/NHS activation followed by functionalization with different primary amines (2) (Huemmerich et al. 2006) or at thiol groups in cysteine modified variants through maleimide chemistry (3) (Spiess et al. 2010; Humenik et al. 2011; Schacht and Scheibel 2011)

Thiol modification was performed using maleimide, which reacts selectively and quantitatively in a single step procedure with thiol groups forming a stable thioether bond (Partis et al. 1983; Heitz et al. 1968). It has been shown that after eADF4(C16) film formation, target molecules like maleimide-conjugated fluorescein, monomaleimido-nanogold particles and β -galactosidase (in combination with NHS-PEO₁₂-Maleimide crosslinker) could be successfully coupled (Spiess et al. 2010). Since there are no side-reactive complications, like in the case of carbodiimide activation (glutamic acid residues), the reaction was further used to couple a maleimide modified cyclic RGD peptide (Wohlrab et al. 2012).

10.4.3 Silk-Polymer Hybrids

Silk peptides can be combined with synthetic polymers like poly(ethylene glycol) (PEG) or poly(isoprene) to achieve new functionalities (Zhou et al. 2006; Rathore and Sogah 2001). Rathore and Sogah designed a *N. clavipes*-inspired block-copolymer by selective replacement of the amorphous peptide domain with flexible non-peptidic poly(ethylene glycol) (PEG) blocks, while retaining the poly(alanine) sequences (Rathore and Sogah 2001). The silk-polymer hybrids were synthesized with varying chain length of the poly(alanines) blocks via prefabricated blocks which were linked block by block (Lego method) (Winningham and Sogah 1997; Rathore and Sogah 2001). Despite the replacement, the silk peptide blocks achieved β -sheet conformation in the resulting polymer. Next, the mechanical properties of silk-polymer films and fibers were determined. Compared with films made of a *B. mori*-inspired block copolymer, the spider silk-inspired analogue films were tougher and stronger. Furthermore, increasing the length of the poly(alanine) block resulted in increased elastic modulus and tensile strength. As a result of the higher stiffness, the elongation at break decreased with increasing length of the poly(alanine) block (Rathore and Sogah 2001).

Since oligo- and polythiophenes are an interesting class of (semi)conducting materials, Klok et al. established the synthesis of diblock oligomers with oligo(3-alkylthiophene) (HT-O3AT) and the silk inspired pentapeptide (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly) via solid phase acylation of the resin-bound pentapeptide for electronic applications. In addition to β -alkylated oligothiophenes which usually form organized lamellar assemblies, silk peptide conjugate assembly is driven by directed hydrogen bonding interactions (Klok et al. 2004).

In one approach a low-molecular-weight gelator (LMWGs) based on the silk-like tetrapeptide Gly-Ala-Gly-Ala was designed. To introduce additional van der Waals interactions and to regulate the solubility, apolar alkyl tails (C₁₂) were added as terminal groups (Escuder and Miravet 2006). Gels with a β -sheet fibril network were obtained in several organic solvents like tetrahydrofuran, chloroform, cyclohexane or toluene. The fibrils (less than 20 nm) assembled into a network of bundles with a length of several micrometers and a width of ~ 100 nm (Escuder and Miravet 2006). By varying the alkyl chain length (from C₃ to C₁₂) or by adding aromatic

groups (phenyl or 4-nitrophenyl), the gelation behavior in different polar and apolar solvents could be controlled. For example, only compounds with similar alkyl chains on both ends formed gels in acetone, whereas compounds with dissimilar alkyl chains were not able to form gels (Iqbal et al. 2008).

10.5 Outlook

Spider silks are known for their outstanding mechanical properties and their biocompatibility since ages. Over the last decades, scientists developed several approaches to produce spider silk proteins recombinantly. Although major improvements have been made, certain questions still remain, concerning assembly, solubility and storage of spider silk proteins. Nevertheless, the possibility to process spider silk proteins into various morphologies together with the ability to produce different spider silk chimera and spider silk inspired polymers will allow various applications in medical and technical fields.

Acknowledgements This work was supported by DFG SCHE 603/4-4. The authors would like to thank Gregor Lang, Claudia Blüm and Aniela Heidebrecht for providing images and data.

References

- An B, Hinman MB, Holland GP, Yarger JL, Lewis RV (2011) Inducing beta-sheets formation in synthetic spider silk fibers by aqueous post-spin stretching. *Biomacromolecules* 12(6):2375–2381. doi:[10.1021/bm200463e](https://doi.org/10.1021/bm200463e)
- Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, Bayley H (1998) Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49(1):31–38. doi:[10.1007/s002530051133](https://doi.org/10.1007/s002530051133)
- Arcidiacono S, Mello CM, Butler M, Welsh E, Soares JW, Allen A, Ziegler D, Laue T, Chase S (2002) Aqueous processing and fiber spinning of recombinant spider silks. *Macromolecules* 35(4):1262–1266. doi:[10.1021/ma011471o](https://doi.org/10.1021/ma011471o)
- Askarieh G, Hedhammar M, Nordling K, Saenz A, Casals C, Rising A, Johansson J, Knight SD (2010) Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature* 465(7295):236–238. doi:[10.1038/nature08962](https://doi.org/10.1038/nature08962)
- Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, Collin MA, Hayashi CY (2007) Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PLoS One* 2(6):e514. doi:[10.1371/journal.pone.0000514](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000514)
- Bauer F, Wohlrab S, Scheibel T (2013) Controllable cell adhesion, growth and orientation on layered silk protein films. *Biomater Sci*. doi:[10.1039/C3BM60114E](https://doi.org/10.1039/C3BM60114E)
- Baumgarten PK (1971) Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci* 36(1):71–79. doi:[10.1016/0021-9797\(71\)90241-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(71)90241-4)
- Belton DJ, Mieszawska AJ, Currie HA, Kaplan DL, Perry CC (2012) Silk-silica composites from genetically engineered chimeric proteins: materials properties correlate with silica condensation rate and colloidal stability of the proteins in aqueous solution. *Langmuir* 28(9):4373–4381. doi:[10.1021/La205084z](https://doi.org/10.1021/La205084z)

- Bini E, Foo CW, Huang J, Karageorgiou V, Kitchel B, Kaplan DL (2006) RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules* 7(11):3139–3145. doi:[10.1021/bm0607877](https://doi.org/10.1021/bm0607877)
- Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG, Neretina TV, Orchanskyi IA, Makeev VY, Tumanyan VG, Shaitan KV, Debabov VG, Kirpichnikov MP (2009) A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J Neuroimmune Pharmacol* 4(1):17–27. doi:[10.1007/s11481-008-9129-z](https://doi.org/10.1007/s11481-008-9129-z)
- Breslauer DN, Lee LP, Muller SJ (2009) Simulation of flow in the silk gland. *Biomacromolecules* 10(1):49–57. doi:[10.1021/Bm800752x](https://doi.org/10.1021/Bm800752x)
- Brooks AE, Nelson SR, Jones JA, Koenig C, Hinman M, Stricker S, Lewis RV (2008a) Distinct contributions of model MaSp1 and MaSp2 like peptides to the mechanical properties of synthetic major ampullate silk fibers as revealed in silico. *Nanotechnol Sci Appl* 1:9–16. doi:[10.2147/NSA.S3961](https://doi.org/10.2147/NSA.S3961)
- Brooks AE, Stricker SM, Joshi SB, Kamerzell TJ, Middaugh CR, Lewis RV (2008b) Properties of synthetic spider silk fibers based on *Argiope aurantia* MaSp2. *Biomacromolecules* 9(6):1506–1510. doi:[10.1021/bm701124p](https://doi.org/10.1021/bm701124p)
- Buchko CJ, Chen LC, Shen Y, Martin DC (1999) Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer* 40(26):7397–7407. doi:[10.1016/S0032-3861\(98\)00866-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00866-0)
- Carrico IS (2008) Chemoselective modification of proteins: hitting the target. *Chem Soc Rev* 37(7):1423–1431. doi:[10.1039/B703364h](https://doi.org/10.1039/B703364h)
- Chengjie F, Zhengzhong S, Vollrath F (2009) Animal silks: their structures, properties and artificial production. *Chem Commun* 43:6515–6529. doi:[10.1039/B911049F](https://doi.org/10.1039/B911049F)
- Colgin MA, Lewis RV (1998) Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like “spacer regions”. *Protein Sci* 7(3):667–672. doi:[10.1002/pro.5560070315](https://doi.org/10.1002/pro.5560070315)
- Currie HA, Deschaume O, Naik RR, Perry CC, Kaplan DL (2011) Genetically engineered chimeric silk-silver binding proteins. *Adv Funct Mater* 21(15):2889–2895. doi:[10.1002/adfm.201100249](https://doi.org/10.1002/adfm.201100249)
- Eisoldt L, Hardy JG, Heim M, Scheibel TR (2010) The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J Struct Biol* 170(2):413–419. doi:[10.1016/j.jsb.2009.12.027](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.12.027)
- Eisoldt L, Scheibel T, Smith A (2011) Decoding the secrets of spider silk. *Mater Today* 14(3):80–86. doi:[10.1016/S1369-7021\(11\)70057-8](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70057-8)
- Elices M, Guinea GV, Plaza GR, Karatzas C, Riekel C, Agulló-Rueda F, Daza R, Pérez-Rigueiro J (2011) Bioinspired fibers follow the track of natural spider silk. *Macromolecules* 44(5):1166–1176. doi:[10.1021/ma102291m](https://doi.org/10.1021/ma102291m)
- Escuder B, Miravet JF (2006) Silk-inspired low-molecular-weight organogelator. *Langmuir* 22(18):7793–7797. doi:[10.1021/La060499w](https://doi.org/10.1021/La060499w)
- Exler JH, Hummerich D, Scheibel T (2007) The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angew Chem Int Ed* 46(19):3559–3562. doi:[10.1002/anie.200604718](https://doi.org/10.1002/anie.200604718)
- Fahnestock S (1994) Novel, recombinantly produced spider silk analogs. USA Patent WO 94/29450, 22 Dec 1994
- Fahnestock SR, Irwin SL (1997) Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 47(1):23–32. doi:[10.1007/s002530050883](https://doi.org/10.1007/s002530050883)
- Foo CWP, Patwardhan SV, Belton DJ, Kitchel B, Anastasiades D, Huang J, Naik RR, Perry CC, Kaplan DL (2006) Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(25):9428–9433. doi:[10.1073/pnas.0601096103](https://doi.org/10.1073/pnas.0601096103)
- Frenot A, Chronakis IS (2003) Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 8(1):64–75. doi:[10.1016/S1359-0294\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00004-9)
- Fukushima Y (1998) Genetically engineered syntheses of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequence of spider dragline silk. *Biopolymers* 45(4):269–279. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-0282\(19980405\)4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)4)
- Garb JE, Ayoub NA, Hayashi CY (2010) Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains. *BMC Evol Biol* 10:243. doi:[10.1186/1471-2148-10-243](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-243)

- Geurts P, Zhao L, Hsia Y, Gnesa E, Tang S, Jeffery F, Mattina CL, Franz A, Vierra C (2010) Synthetic spider silk fibers spun from pyriform spidroin 2, a glue silk protein discovered in orb-weaving spider attachment discs. *Biomacromolecules* 11(12):3495–3503. doi:[10.1021/bm101002w](https://doi.org/10.1021/bm101002w)
- Gnesa E, Hsia Y, Yarger JL, Weber W, Lin-Cereghino J, Lin-Cereghino G, Tang S, Agari K, Vierra C (2012) Conserved C-terminal domain of spider tubuliform spidroin 1 contributes to extensibility in synthetic fibers. *Biomacromolecules* 13(2):304–312. doi:[10.1021/bm201262n](https://doi.org/10.1021/bm201262n)
- Gomes SC, Leonor IB, Mano JF, Reis RL, Kaplan DL (2011) Antimicrobial functionalized genetically engineered spider silk. *Biomaterials* 32(18):4255–4266. doi:[10.1016/j.biomaterials.2011.02.040](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.040)
- Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS, Savage KN (1999) The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol* 202(23):3295–3303
- Greiner A, Wendorff JH (2007) Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angew Chem Int Ed* 46(30):5670–5703. doi:[10.1002/anie.200604646](https://doi.org/10.1002/anie.200604646)
- Grip S, Rising A, Nimmervoll H, Storckenfeldt E, McQueen-Mason SJ, Pouchkina-Stantcheva N, Vollrath F, Engström W, Fernandez-Arias A (2006) Transient expression of a major ampullate spidroin 1 gene fragment from *Euprosthenops* sp. in mammalian cells. *Cancer Genomics Proteomics* 3(2):83–87
- Guerette PA, Ginzinger DG, Weber BHF, Gosline JM (1996) Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* 272(5258):112–115. doi:[10.1126/science.272.5258.112](https://doi.org/10.1126/science.272.5258.112)
- Hagn F, Eisoldt L, Hardy JG, Vendrely C, Coles M, Scheibel T, Kessler H (2010) A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* 465(7295):239–242. doi:[10.1038/nature08936](https://doi.org/10.1038/nature08936)
- Hagn F, Thamm C, Scheibel T, Kessler H (2011) pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk—implications for fiber formation. *Angew Chem Int Ed* 50(1):310–313. doi:[10.1002/anie.201003795](https://doi.org/10.1002/anie.201003795)
- Hardy JG, Romer LM, Scheibel TR (2008) Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* 49(20):4309–4327. doi:[10.1016/j.polymer.2008.08.006](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.08.006)
- Hayashi CY, Blackledge TA, Lewis RV (2004) Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Mol Biol Evol* 21(10):1950–1959. doi:[10.1093/molbev/msh204](https://doi.org/10.1093/molbev/msh204)
- Hedhammar M, Rising A, Grip S, Martinez AS, Nordling K, Casals C, Stark M, Johansson J (2008) Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthenops australis*: implications for fiber formation. *Biochemistry* 47(11):3407–3417. doi:[10.1021/bi702432y](https://doi.org/10.1021/bi702432y)
- Heikkilä P, Harlin A (2008) Parameter study of electrospinning of polyamide-6. *Eur Polym J* 44(10):3067–3079. doi:[10.1016/j.eurpolymj.2008.06.032](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.06.032)
- Heim M, Keerl D, Scheibel T (2009) Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angew Chem Int Ed* 48(20):3584–3596. doi:[10.1002/anie.200803341](https://doi.org/10.1002/anie.200803341)
- Heim M, Ackerschott CB, Scheibel T (2010) Characterization of recombinantly produced spider flagelliform silk domains. *J Struct Biol* 170(2):420–425. doi:[10.1016/j.jsb.2009.12.025](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.12.025)
- Heitz JR, Anderson CD, Anderson BM (1968) Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides. *Arch Biochem Biophys* 127(1–3):627–636. doi:[10.1016/0003-9861\(68\)90271-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90271-3)
- Hu XY, Yuan J, Wang XD, Vasanthavada K, Falick AM, Jones PR, La Mattina C, Vierra CA (2007) Analysis of aqueous glue coating proteins on the silk fibers of the cob weaver, *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry* 46(11):3294–3303. doi:[10.1021/bi602507e](https://doi.org/10.1021/bi602507e)
- Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Sci Technol* 63(15):2223–2253. doi:[10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7)
- Huang J, Wong C, George A, Kaplan DL (2007) The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein 1 chimeric protein on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials* 28(14):2358–2367. doi:[10.1016/j.biomaterials.2006.11.021](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.021)

- Huemmerich D, Helsen CW, Quedzuweit S, Oschmann J, Rudolph R, Scheibel T (2004a) Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* 43(42):13604–13612. doi:[10.1021/Bi048983q](https://doi.org/10.1021/Bi048983q)
- Huemmerich D, Scheibel T, Vollrath F, Cohen S, Gat U, Ittah S (2004b) Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Curr Biol* 14(22):2070–2074. doi:[10.1016/j.cub.2004.11.005](https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.005)
- Huemmerich D, Slotta U, Scheibel T (2006) Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Appl Phys A: Mater Sci Process* 82(2):219–222. doi:[10.1007/s00339-005-3428-5](https://doi.org/10.1007/s00339-005-3428-5)
- Humenik M, Smith AM, Scheibel T (2011) Recombinant spider silks—biopolymers with potential for future applications. *Polymers* 3(1):640–661. doi:[10.3390/polym3010640](https://doi.org/10.3390/polym3010640)
- Iqbal S, Miravet JF, Escuder B (2008) Biomimetic self-assembly of tetrapeptides into fibrillar networks and organogels. *Eur J Org Chem* 27:4580–4590. doi:[10.1002/ejoc.200800547](https://doi.org/10.1002/ejoc.200800547)
- Ittah S, Cohen S, Garty S, Cohn D, Gat U (2006) An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. *Biomacromolecules* 7(6):1790–1795. doi:[10.1021/bm060120k](https://doi.org/10.1021/bm060120k)
- Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL (2002) Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* 3(6):1233–1239. doi:[10.1021/Bm025581u](https://doi.org/10.1021/Bm025581u)
- Karatzas CN, Turner JD, Karatzas A-L (1999) Production of biofilaments in transgenic animals. Canada Patent WO 99/47661
- Keerl D, Scheibel T (2012) Characterization of natural and biomimetic spider silk fibers. *Bioinspired Biomim Nanobiomaterials* 1(2):83–94. doi:[10.1680/bbn.11.00016](https://doi.org/10.1680/bbn.11.00016)
- Kinahan ME, Filippidi E, Koster S, Hu X, Evans HM, Pfohl T, Kaplan DL, Wong J (2011) Tunable silk: using microfluidics to fabricate silk fibers with controllable properties. *Biomacromolecules* 12(5):1504–1511. doi:[10.1021/bm1014624](https://doi.org/10.1021/bm1014624)
- Klok HA, Rosler A, Gotz G, Mena-Osteritz E, Bauerle P (2004) Synthesis of a silk-inspired peptide oligothiophene conjugate. *Org Biomol Chem* 2(24):3541–3544. doi:[10.1039/B415454a](https://doi.org/10.1039/B415454a)
- Knight DP, Vollrath F (1999) Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proc Biol Sci* 266(1418):519–523. doi:[10.1098/rspb.1999.0667](https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0667)
- Lang G, Jokisch S, Scheibel T (2013) Air filter devices including nonwoven meshes of electrospun recombinant spider silk proteins. *J Vis Exp* 75:e50492. doi:[10.3791/50492](https://doi.org/10.3791/50492)
- Lawrence BA, Vierra CA, Moore AMF (2004) Molecular and mechanical properties of major ampullate silk of the black widow spider, *Latrodectus hesperus*. *Biomacromolecules* 5(3):689–695. doi:[10.1021/Bm0342640](https://doi.org/10.1021/Bm0342640)
- Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y, Zhou JF, Duguay F, Chretien N, Welsh EA, Soares JW, Karatzas CN (2002) Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* 295(5554):472–476. doi:[10.1126/science.1065780](https://doi.org/10.1126/science.1065780)
- Leal-Egana A, Scheibel T (2012) Interactions of cells with silk surfaces. *J Mater Chem* 22(29):14330–14336. doi:[10.1039/C2jm31174g](https://doi.org/10.1039/C2jm31174g)
- Leal-Egana A, Lang G, Mauere C, Wickinghoff J, Weber M, Geimer S, Scheibel T (2012) Interactions of fibroblasts with different morphologies made of an engineered spider silk protein. *Adv Eng Mater* 14(3):B67–B75. doi:[10.1002/adem.201180072](https://doi.org/10.1002/adem.201180072)
- Lee KS, Kim BY, Je YH, Woo SD, Sohn HD, Jin BR (2007) Molecular cloning and expression of the C-terminus of spider flagelliform silk protein from *Araneus ventricosus*. *J Biosci* 32(4):705–712. doi:[10.1007/s12038-007-0070-8](https://doi.org/10.1007/s12038-007-0070-8)
- Lewis RV, Hinman M, Kothakota S, Fournier MJ (1996) Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins. *Protein Express Purif* 7(4):400–406. doi:[10.1006/prep.1996.0060](https://doi.org/10.1006/prep.1996.0060)
- Lin Z, Huang W, Zhang J, Fan JS, Yang D (2009) Solution structure of eggcase silk protein and its implications for silk fiber formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(22):8906–8911. doi:[10.1073/pnas.0813255106](https://doi.org/10.1073/pnas.0813255106)
- Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Graslund A (2011) Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 2011:10 p. doi:[10.1155/2011/414729](https://doi.org/10.1155/2011/414729)

- Mello CM, Soares JW, Arcidiacono S, Butlers MM (2004) Acid extraction and purification of recombinant spider silk proteins. *Biomacromolecules* 5(5):1849–1852. doi:[10.1021/Bm049815g](https://doi.org/10.1021/Bm049815g)
- Menassa R, Hong Z, Karatzas CN, Lazaris A, Richman A, Brandle J (2004) Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant Biotechnol J* 2(5):431–438. doi:[10.1111/j.1467-7652.2004.00087.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00087.x)
- Mieszawska AJ, Nadkarni LD, Perry CC, Kaplan DL (2010) Nanoscale control of silica particle formation via silk-silica fusion proteins for bone regeneration. *Chem Mater* 22(20):5780–5785. doi:[10.1021/Cm101940u](https://doi.org/10.1021/Cm101940u)
- Morgan AW, Roskov KE, Lin-Gibson S, Kaplan DL, Becker ML, Simon CG Jr (2008) Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 29(16):2556–2563. doi:[10.1016/j.biomaterials.2008.02.007](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.02.007)
- Motriuk-Smith D, Smith A, Hayashi CY, Lewis RV (2005) Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* 6(6):3152–3159. doi:[10.1021/bm050472b](https://doi.org/10.1021/bm050472b)
- Numata K, Kaplan DL (2010) Silk-based gene carriers with cell membrane destabilizing peptides. *Biomacromolecules* 11(11):3189–3195. doi:[10.1021/Bm101055m](https://doi.org/10.1021/Bm101055m)
- Numata K, Subramanian B, Currie HA, Kaplan DL (2009) Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials* 30(29):5775–5784. doi:[10.1016/j.biomaterials.2009.06.028](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.028)
- Numata K, Reagan MR, Goldstein RH, Rosenblatt M, Kaplan DL (2011) Spider silk-based gene carriers for tumor cell-specific delivery. *Bioconjug Chem* 22(8):1605–1610. doi:[10.1021/bc200170u](https://doi.org/10.1021/bc200170u)
- Numata K, Mieszawska-Czajkowska AJ, Kvenvold LA, Kaplan DL (2012) Silk-based nanocomplexes with tumor-homing peptides for tumor-specific gene delivery. *Macromol Biosci* 12(1):75–82. doi:[10.1002/mabi.201100274](https://doi.org/10.1002/mabi.201100274)
- Partis MD, Griffiths DG, Roberts GC, Beechey RB (1983) Cross-linking of protein by omega-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. *J Protein Chem* 2(3):263–277. doi:[10.1007/BF01025358](https://doi.org/10.1007/BF01025358)
- Prince JT, Mcgrath KP, Digirolamo CM, Kaplan DL (1995) Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry* 34(34):10879–10885. doi:[10.1021/bi00034a022](https://doi.org/10.1021/bi00034a022)
- Rammensee S, Slotta U, Scheibel T, Bausch AR (2008) Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(18):6590–6595. doi:[10.1073/pnas.0709246105](https://doi.org/10.1073/pnas.0709246105)
- Rathore O, Sogah DY (2001) Self-assembly of beta-sheets into nanostructures by poly(alanine) segments incorporated in multiblock copolymers inspired by spider silk. *J Am Chem Soc* 123(22):5231–5239. doi:[10.1021/Ja004030d](https://doi.org/10.1021/Ja004030d)
- Rising A, Hjalms G, Engstrom W, Johansson J (2006) N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriform spider silk proteins. *Biomacromolecules* 7(11):3120–3124. doi:[10.1021/bm060693x](https://doi.org/10.1021/bm060693x)
- Schacht K, Scheibel T (2011) Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules* 12(7):2488–2495. doi:[10.1021/Bm200154k](https://doi.org/10.1021/Bm200154k)
- Scheibel T (2004) Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb Cell Fact* 3(1):14. doi:[10.1186/1475-2859-3-14](https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-14)
- Schmidt M, Romer L, Strehle M, Scheibel T (2007) Conquering isoleucine auxotrophy of *Escherichia coli* BLR(DE3) to recombinantly produce spider silk proteins in minimal media. *Biotechnol Lett* 29(11):1741–1744. doi:[10.1007/s10529-007-9461-z](https://doi.org/10.1007/s10529-007-9461-z)
- Seidel A, Liivak O, Jelinski LW (1998) Artificial spinning of spider silk. *Macromolecules* 31(19):6733–6736. doi:[10.1021/ma9808880](https://doi.org/10.1021/ma9808880)
- Seidel A, Liivak O, Calve S, Adaska J, Ji GD, Yang ZT, Grubb D, Zax DB, Jelinski LW (2000) Regenerated spider silk: processing, properties, and structure. *Macromolecules* 33(3):775–780. doi:[10.1021/ma990893j](https://doi.org/10.1021/ma990893j)
- Sletten EM, Bertozzi CR (2009) Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int Ed* 48(38):6974–6998. doi:[10.1002/anie.200900942](https://doi.org/10.1002/anie.200900942)

- Spiess K, Wohlrab S, Scheibel T (2010) Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* 6(17):4168–4174. doi:[10.1039/B927267d](https://doi.org/10.1039/B927267d)
- Sponner A, Unger E, Grosse F, Weissshart K (2004) Conserved C-termini of spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread. *Biomacromolecules* 5(3):840–845. doi:[10.1021/bm034378b](https://doi.org/10.1021/bm034378b)
- Sponner A, Vater W, Rommerskirch W, Vollrath F, Unger E, Grosse F, Weissshart K (2005) The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochem Biophys Res Commun* 338(2):897–902. doi:[10.1016/j.bbrc.2005.10.048](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.048)
- Stark M, Grip S, Rising A, Hedhammar M, Engstrom W, Hjalmar G, Johansson J (2007) Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules* 8(5):1695–1701. doi:[10.1021/Bm070049y](https://doi.org/10.1021/Bm070049y)
- Szela S, Avtges P, Valluzzi R, Winkler S, Wilson D, Kirschner D, Kaplan DL (2000) Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk. *Biomacromolecules* 1(4):534–542. doi:[10.1021/Bm0055697](https://doi.org/10.1021/Bm0055697)
- Teulé F, Aubé C, Ellison M, Abbott A (2003) Biomimetic manufacturing of customised novel fibre proteins for specialised applications. *AUTEX Res J* 3(4):160–165
- Teulé F, Furin WA, Cooper AR, Duncan JR, Lewis RV (2007) Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *J Mater Sci* 42(21):8974–8985. doi:[10.1007/s10853-007-1642-6](https://doi.org/10.1007/s10853-007-1642-6)
- Teulé F, Cooper AR, Furin WA, Bittencourt D, Rech EL, Brooks A, Lewis RV (2009) A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nat Protoc* 4(3):341–355. doi:[10.1038/nprot.2008.250](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.250)
- Teulé F, Addison B, Cooper AR, Ayon J, Henning RW, Benmore CJ, Holland GP, Yarger JL, Lewis RV (2011) Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers* 97(6):418–431. doi:[10.1002/bip.21724](https://doi.org/10.1002/bip.21724)
- Thordarson P, Le Droumaguet B, Velonia K (2006) Well-defined protein-polymer conjugates-synthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 73(2):243–254. doi:[10.1007/s00253-006-0574-4](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0574-4)
- Valluzzi R, Szela S, Avtges P, Kirschner D, Kaplan D (1999) Methionine redox controlled crystallization of biosynthetic silk spidroin. *J Phys Chem B* 103(51):11382–11392. doi:[10.1021/jp991363s](https://doi.org/10.1021/jp991363s)
- Vendrey C, Scheibel T (2007) Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol Biosci* 7(4):401–409. doi:[10.1002/mabi.200600255](https://doi.org/10.1002/mabi.200600255)
- Vendrey C, Ackerschott C, Roemer L, Scheibel T (2008) Molecular design of performance proteins with repetitive sequences: recombinant flagelliform spider silk as basis for biomaterials. *Methods Mol Biol* 474:3–14. doi:[10.1007/978-1-59745-480-3_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-480-3_1)
- Vollrath F, Madsen B, Shao ZZ (2001) The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *Proc R Soc Lond B* 268(1483):2339–2346. doi:[10.1098/rspb.2001.1590](https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1590)
- Wang M, Yu JH, Kaplan DL, Rutledge GC (2006) Production of submicron diameter silk fibers under benign processing conditions by two-fluid electrospinning. *Macromolecules* 39(3):1102–1107. doi:[10.1021/Ma0517749](https://doi.org/10.1021/Ma0517749)
- Wen HX, Lan XQ, Zhang YS, Zhao TF, Wang YJ, Kajiura Z, Nakagaki M (2010) Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol Biol Rep* 37(4):1815–1821. doi:[10.1007/s11033-009-9615-2](https://doi.org/10.1007/s11033-009-9615-2)
- Widmaier DM, Voigt CA (2010) Quantification of the physiochemical constraints on the export of spider silk proteins by *Salmonella* type III secretion. *Microb Cell Fact* 9:78. doi:[10.1186/1475-2859-9-78](https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-78)
- Widmaier DM, Tullman-Ercek D, Mirsky EA, Hill R, Govindarajan S, Minshall J, Voigt CA (2009) Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers. *Mol Syst Biol* 5:309. doi:[10.1038/msb.2009.62](https://doi.org/10.1038/msb.2009.62)
- Winkler S, Szela S, Avtges P, Valluzzi R, Kirschner DA, Kaplan D (1999) Designing recombinant spider silk proteins to control assembly. *Int J Biol Macromol* 24(2–3):265–270. doi:[10.1016/S0141-8130\(98\)00088-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00088-9)

- Winkler S, Wilson D, Kaplan DL (2000) Controlling beta-sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic phosphorylation/dephosphorylation. *Biochemistry* 39(41):12739–12746. doi:[10.1021/Bi001335w](https://doi.org/10.1021/Bi001335w)
- Winningham MJ, Sogah DY (1997) A modular approach to polymer architecture control via catenation of prefabricated biomolecular segments: polymers containing parallel beta-sheets templated by a phenoxathiin-based reverse turn mimic. *Macromolecules* 30(4):862–876. doi:[10.1021/ma960804s](https://doi.org/10.1021/ma960804s)
- Wohlrab S, Mueller S, Schmidt A, Neubauer S, Kessler H, Leal-Egana A, Scheibel T (2012) Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* 33(28):6650–6659. doi:[10.1016/j.biomaterials.2012.05.069](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.069)
- Wong Po Foo C, Patwardhan SV, Belton DJ, Kitchel B, Anastasiades D, Huang J, Naik RR, Perry CC, Kaplan DL (2006) Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(25):9428–9433. doi:[10.1073/pnas.0601096103](https://doi.org/10.1073/pnas.0601096103)
- Xia XX, Ki CS, Park YH, Kaplan DL, Lee SY (2010) Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(32):14059–14063. doi:[10.1073/pnas.1003366107](https://doi.org/10.1073/pnas.1003366107)
- Xu M, Lewis RV (1990) Structure of a protein superfiber – spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(18):7120–7124. doi:[10.1073/pnas.87.18.7120](https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7120)
- Xu HT, Fan BL, Yu SY, Huang YH, Zhao ZH, Lian ZX, Dai YP, Wang LL, Liu ZL, Fei J, Li N (2007) Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Anim Biotechnol* 18(1):1–12. doi:[10.1080/10495390601091024](https://doi.org/10.1080/10495390601091024)
- Yang JJ, Barr LA, Fahnestock SR, Liu ZB (2005) High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res* 14(3):313–324. doi:[10.1007/s11248-005-0272-5](https://doi.org/10.1007/s11248-005-0272-5)
- Zarkoob S, Eby RK, Reneker DH, Hudson SD, Ertley D, Adams WW (2004) Structure and morphology of electrospun silk nanofibers. *Polymer* 45(11):3973–3977. doi:[10.1016/j.polymer.2003.10.102](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.102)
- Zhou CZ, Confalonieri F, Jacquet M, Perasso R, Li ZG, Janin J (2001) Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins: Struct Funct Genet* 44(2):119–122. doi:[10.1002/prot.1078](https://doi.org/10.1002/prot.1078)
- Zhou CC, Leng BX, Yao JR, Qian J, Chen X, Zhou P, Knight DP, Shao ZZ (2006) Synthesis and characterization of multiblock copolymers based on spider dragline silk proteins. *Biomacromolecules* 7(8):2415–2419. doi:[10.1021/Bm060199t](https://doi.org/10.1021/Bm060199t)
- Zorko M, Langel U (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57(4):529–545. doi:[10.1016/j.addr.2004.10.010](https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.10.010)

6.4. TEILARBEIT IV

The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins

Eisoldt, L., Thamm, C. and Scheibel, T.

Veröffentlicht in *Biopolymers* 97(6): 355-361.

2012

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlages John Wiley and Sons.

Review

The Role of Terminal Domains During Storage and Assembly of Spider Silk Proteins

Lukas Eisoldt, Christopher Thamm, Thomas Scheibel

Universität Bayreuth, Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften, Lehrstuhl Biomaterialien,
Universitätsstraße 30, Bayreuth 95447, Germany

Received 4 August 2011; accepted 21 October 2011

Published online 5 November 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22006

ABSTRACT:

Fibrous proteins in nature fulfill a wide variety of functions in different structures ranging from cellular scaffolds to very resilient structures like tendons and even extra-corporal fibers such as silks in spider webs or silkworm cocoons. Despite their different origins and sequence varieties many of these fibrous proteins share a common building principle: they consist of a large repetitive core domain flanked by relatively small non-repetitive terminal domains. Amongst protein fibers, spider dragline silk shows prominent mechanical properties that exceed those of man-made fibers like Kevlar. Spider silk fibers assemble in a spinning process allowing the transformation from an aqueous solution into a solid fiber within milliseconds. Here, we highlight the role of the non-repetitive terminal domains of spider dragline silk proteins during storage in the gland and initiation of the fiber assembly process. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers* 97: 355–361, 2012.

Keywords: spider silk; biomaterials; silk assembly; non-repetitive termini; fibrous proteins

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the Biopolymers editorial office at biopolymers@wiley.com

INTRODUCTION

Fibrous proteins are present within all kingdoms of life and widely divergent organisms, ranging from protozoa to humans. One of the most abundant proteins in mammals is the fibrous protein collagen. Although collagen fibers have some remarkable mechanical properties,¹ several extra-corporal protein fibers exceed even these. Prominent examples are the byssus of mussels which contains pre-collagens as major building blocks and the silk fibers used in the cocoon of the mulberry silkworm *Bombyx mori* or in spider silk found in orb webs. For details see recent reviews on human collagens,¹ mussel pre-collagens,^{2,3} silkworm silk,^{4,5} and spider silk.^{6–9}

Here, we highlight some similarities concerning assembly of the proteins into fibers. All four protein classes exhibit a highly repetitive core region with specific amino acid motifs repeated up to several hundred times. The repetitive core regions largely determine the macroscopic properties of the fibers, i.e., their mechanical behavior. However, the precise control of initiating assembly and of fiber elongation depends on non-repetitive terminal domains which can be post-translationally modified and proteolytically processed as is the case with mammalian collagens (Figure 1). In both silkworm and spider silk, as well as in the mussel pre-collagens, the terminal regions are likely maintained in the mature protein, possibly without proteolytical processing.^{3,10} The role of the termini during storage and assembly has been thoroughly characterized in case of mammalian collagen. Here, we highlight recent results concerning the role of

Correspondence to: Thomas Scheibel; e-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

Contract grant sponsor: US Army grant

Contract grant number: W911NF-08-1-0284

Contract grant sponsor: DFG project

Contract grant number: SCHE603/4-4

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

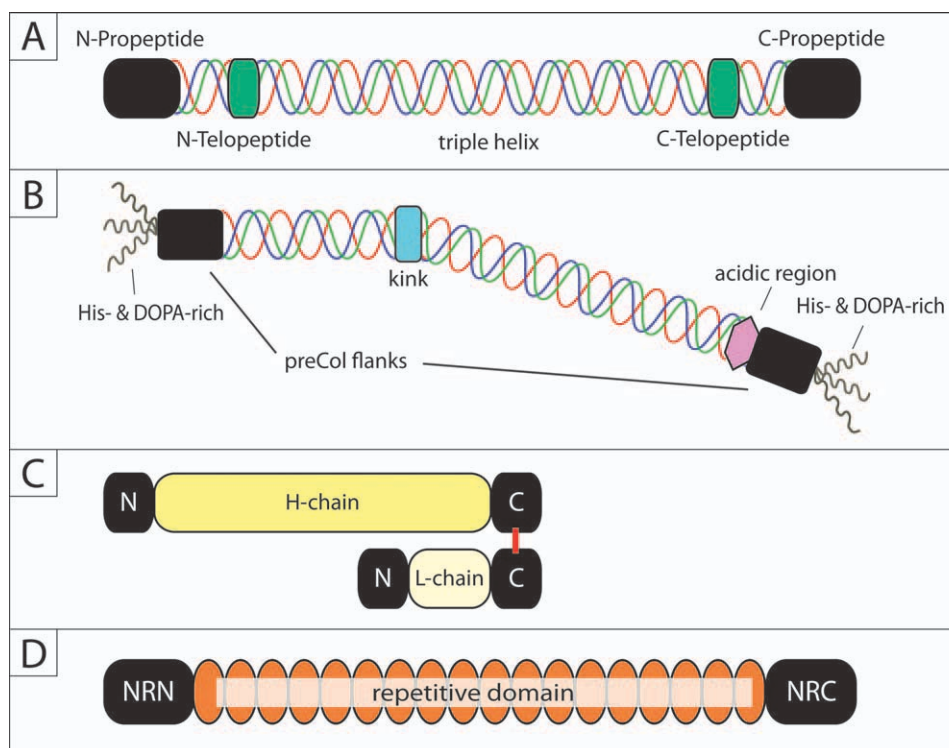


FIGURE 1 Schematic illustration of four fibrous proteins and their terminal domains. (A) Procollagen, comprising a triple helical core domain, amino- and carboxy-terminal propeptides as well as telopeptides. The carboxy-terminal propeptide is known to direct the formation of the triple helix, whereas the telopeptides mediate lateral assembly into collagen fibrils (B) Mussel pre-collagens consist of a triple helical domain, flanked by preCol-specific regions (silk-, elastin-, or cell-wall-like). The outermost regions are rich in histidine and DOPA (dihydroxyphenylalanine) residues. (C) Silkworm fibroin consisting of a covalently linked highly repetitive heavy and non-repetitive light chain. (D) Spider silk spidroins consist of a large repetitive core domain flanked by non-repetitive amino-(NRN) and carboxy-terminal (NRC) domains.

terminal domains in spider silk proteins in storage and assembly.

SPIDER SILK PROTEINS

Female spiders from the order *Araneae* are able to produce up to seven different silk types each tailored to a specific purpose (i.e., web frame, capture spiral, prey wrapping, glueing etc.) with different mechanical properties (for more details see Refs.^{11–14} and other chapters of this special issue). The underlying proteins, also called spidroins, are named after the glands in which they are produced, e.g., major ampullate spidroin (MaSp), flagelliform spidroin (FlagSp), or aciniform spidroin (AcSp). Despite the different mechanical properties of the fibers, which are based on different amino acid sequences and on slightly different processing conditions, they all share one common structural principle on a molecular level. All spider silk proteins comprise a large repetitive core sequence, accounting for approximately 90% of the

amino acid residues, flanked by non-repetitive amino-(NRN) and carboxy-terminal (NRC) domains (Figure 1D). The large core domain consists of ensemble repeats, each ensemble consisting of 40–200 amino acids (Figure 2A) which may be repeated up to 100 times in some cases.^{15–18} Some ensembles (in MaSp, MiSp, and FlagSp) comprise distinct amino acid motifs, like β -sheet-crystal forming polyalanine stretches, but the type and arrangement of those small motifs differ significantly between silk types. Therefore, the sequence similarity in the ensemble repeats can be quite low between different silk types.^{12,15}

In contrast to the core domains, the amino- and carboxy-terminal domains are highly conserved for each silk type throughout different species (Figure 2B) and in some cases even between different silk types (Figure 2C).^{19–22} The sequence similarity may decrease between distantly related species, but interestingly, the predicted size of the termini seems to be consistent. While mature NRN-domains (without signal sequences for secretion) are composed of

A	<p>Latrodectus hesperus MaSp1</p> <p>GAGQGGYGRGAGQGGAAGAAAA</p> <p>Argiope argentea TuSp1</p> <p>SSSTTTTSSSTSGSQAASQASASSSQAASASSFAQASSASLAASSSFSSAFSSANTLSALGNVAYQLGFNVANTLGLGNAAGLGAALSQAV SSVGVGASSGTYANAVSNVAGQFLAGQGLNGANAASLASSFASALSASAAVSASSAAQASASQSAASAFSRAASQASQSAARSQAQ</p> <p>Argiope trifasciata AcSp1</p> <p>GSAGPQGGFGATGGASAGLISRANALANTSTLRTVLRTGVSSQIASSVVQRAAQSLASTLGVGNNLARFAVQAVSRLPAGSDTSAYAQAFSSALFNAG VLNASNIDTLGSRVLSALLNGVSSAAQGLGIVNDSGVQSDISSSSSFLSTSSSSASYSQASASSTSGAGYTPGSPSTGPGSGYGPGLGGAPFGQSGFG</p>		<p>Nephila clavipes MiSp1</p> <p>GGYGGQGGYGAGAGAGAAAAAGAGA</p>
B	<p>AtMaSp2 QTVFSAQGGATFWENSQLAESFISRLFRFIGQSGAFSPNQLDDMSIGDTLKTAEIK</p> <p>EaMaSp1 QGSSSLASHTTPWNPGLAENFMNSFMQGLSSMPGFATASQLDDMSITAQSMVQSIQS</p> <p>LgMaSp1 QGLYVIGQANTPWSSKQADAFISAPMTAPSSQSGAFSSQIDDDMSVINTILMAAMDN</p> <p>LhMaSp1 QSLYALAQANTPWSSKANADAFINSFISAASTGSSFDQDQMEDMSLIGNTLMAAMDN</p> <p>LhMaSp2 QSLCALAQANTPWSSKENADAFIFMNAASQSGAFSSQIDDDMSVINTILMAAMDN</p> <p>NiMaSp2 QCIFIAQANTPWSDTATADAFIQFLGAVSGSGAFTPDQLDDMSITVGDITMSAMDK</p> <p>CON QCI--lgqanTPWssk-nAdaFi--fm-a-sqsgaFs-dQLDDMS-igntlmaamdN</p>		
	<p>NRN AtMaSp2 MAQSRKSSKSKLQALNMAFASSMAEIAVAEGGGLSLIEAKTNAIASALSAFLETGTVNQGFVNEIKTLIFMIAQASSNE</p> <p>EaMaSp1 LAQAGRTSPNKLQALNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSIIASAMSNALFQTGTVNQFPFNEITQLVSMFAQAGMND</p> <p>LgMaSp1 MG--GRITPTKLQALDMAFASSVAEIAAVE--GQNIQVTTNAISDALTSAFYQTTGVVNNKFISEIRSLINMFAQASAND</p> <p>LhMaSp1 MG--GRITPSKLQALDMAFASSVAEIAASE--GGDLGVTTNAIADALTSAFYQTTGVVNSRFISEIRSLIGMFAQASAND</p> <p>LhMaSp2 MG--GRITQSKLQALDMAFASSVAEIAVAD--GQNVGAATNAISDALTSAFYQTTGVVNNQFTIGISSLIGMFAQVSGNE</p> <p>NiMaSp2 MARSNKSSKSKLQALNMAFASSMAEIAAVEGGGQSMQVKTNAIANALDSAFYMTTGSTNQGFVNEIRSLINMLSAAVNE</p> <p>CON ma--gripspKLQALNMAFASSMAEIAa-e-g@qslgvktNaIadAl-sAFYqTgTVvNqgfVneirsLi-MfaqasaNe</p>		
	<p>NRC AtMaSp2 SRLSSFGAASRVSSAVTSLVSSGPTNSAALS-----NTISNVVSISSSNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVHLGSAANIGQVNVSSGVGRSASIVGQSSINQAFS</p> <p>LgMaSp1 SALAAFPATSARISSHALTLLSNGPTNPASIS-----NVISNAVSVQISSSNPGYSACDILVQALLELVLTALLTIIGSSNVNDINYGSSGQYQAVMSQSVQNVFG</p> <p>LhMaSp1 SALAAFPATSARISSHASALLSNGPTNPASIS-----NVISNAVSVQISSSNPGASACDVLVQALLELVLTALLTIIGSSNIGSVNYDSSGQYQAVVTQSVQNAFA</p> <p>LhMaSp2 SALSSPTTHARISSHASTLLSNGPTNSAALS-----NVISNAVSVQISANPGSSSCDVLVQALLEITALLISILDSSSVGQVNYGSSGQYQAVGQSSMCQAMG</p> <p>NiMaSp2 SRLASPSDGAARVAASVNLVSSGPTNSAALS-----SVISNAVSVQISANPGSLSGCDVLVQALLEIVSACVTIILSSSSIGQVNYGAA-----</p> <p>CON SalasF-t-aRisshas-LLSsGPTn-AaLS-----nvISNAVSVQissSNPG-S-CDVLVQALLEIvtAl-tilgSsnigqvNygssgqyaq-v-q-s-q-af-</p>		
C	<p>AbCySp1 QSVAVT-AVPEVFSSPMLASGFLQCLTFGIGNSPAFFTOEQQLDIAIAQVILNAVSS</p> <p>LhMaSp1 QSLYALAQANTPWSSKANADAFINSFISAASTGSSFDQDQMEDMSLIGNTLMAAMDN</p> <p>LhTuSp1 NBLSGVSASVNI FNSFNATSPFNCRNTESSPAFFFQEQADLDSIAEVIIISDVSS</p> <p>NiFlag STYGRGIIVNSPFSNPMTAEAPARSFVSNVSSGEFGAQAEDFDDIQSLIQAQ-S</p> <p>NcaCySp1 QALSVATPVPSVFSSPMLASGFLQCLTTGIGLSPAFFTOEQQLDLDLAKVILSANTS</p> <p>NclFlag STYGRGIIVNSPFSNPMTAEAPARSFVSNVSSGEFGAQAEDFDDIQSLIQAQ-S</p> <p>CON qs-----v-s-fsspn-A--Fl-cl-s-i--spaFp-qeq-Dld-iaqvil-av-s</p>		
	<p>NRN AbCySp1 NTGATASAR--AQALSTALASSLTDLLIABSAESNYSNQLSELTGILSDCFIQTGSDNPAFVSRIQSLISVLSQNADTN</p> <p>LhMaSp1 MG--GRITPSKLQALDMAFASSVAEIAASE--GGDLGVTTNAIADALTSAFYQTTGVVNSRFISEIRSLIGMFAQASAND</p> <p>LhTuSp1 -VNTASAT--SLALSTALASSLAKLLVTEAAEDIDNQVVALSTILSQCFVETTGSPNPAFVASVKSLLGLVLSQSASNY</p> <p>NiFlag MGKGRHDTKAKAKAMQVALASSIARLVIAESSGGGVQRKTNVISNARNALMSTTGSNPEEFVHEVQDLIQMLSCOEINE</p> <p>NcaCySp1 NTDTSKSRN--AQALSTALASSLADLLISESSGSYQTIQISALTNIISDCFVTTGSSNPAFVSRIQSLISVLSQNADTN</p> <p>NclFlag MGKGRHDTKAKAKAMQVALASSIARLVIAESSGGGVQRKTNVISNARNALMSTTGSNPEEFVHEVQDLIQMLSCOEINE</p> <p>CON -----sa--aaAlstAlASSlael-i-es-g-d-----l--f--ttgs-n--fv--vq-li--lsq---n-</p>		
	<p>NRC AbCySp1 SGLGSSAATARVSSLANSFASAISSSGGSLSVPTFLNLSSVGAQVSSSSLSLSS-LEVTVNEVLEAIAALLQVINGGSIITSVDLRYVFNAAQDLVHALSG----</p> <p>AbCySp2 SGLGSSAATARVSSLANSFASAISSSGGSLSVPTFLNLSSVGAQVSSSSLSLSSSVTTQVLEAIAALLQVINGAQITSVNFNVSNVNRALVDLSLVGSFA-</p> <p>LhMaSp1 SALAAPATSAARISSHASALLSNGPTNPASIS-----NVISNAVSVQISSSNPGASACDVLVQALLELVLTALLTIIGSSNIGSVNYDSSGQYQAVVTQSVQNAFA-</p> <p>LhTuSp1 AGIASTAATSINDIAQSLSTLS-SCSQLAPDNVLPGLIQSSSIQSGNPDLDPAGVLIESLLEYTSALLALQNAQITTYDAATLPAFNTALVNYLVPVLV--</p> <p>NcaCySp1 SGLSSASASARVGSLSALSTSRGTLSLSTFLNLSPISSEIRANTSLDG-TQATVEALLEALAALLQVINGAQITDVNVSSVPSVNAALASALVA----</p> <p>NiFlag SRVPDMVNGIM-----SAMQSGGFNYQ--MFGNML--SQYSSGSGSCN--PNNVNVIMDALLAALHCLSNHGSSSFAPSTPAAMSAYSNSVGRMFAY</p> <p>NclFlag SRVPDMVNGIM-----SAMQSGGFNYQ--MFGNML--SQYSSGSGSCN--PNNVNVIMDALLAALHCLSNHGSSSFAPSTPAAMSAYSNSVGRMFAY</p> <p>CON sgl-s-aa-ar--s-a-s--sa-s-sg--ls--fln-ls--sq-s-s-s-----v-v-vllea--ALL-i-----itsv--s-p--al-nsi--fa-</p>		

FIGURE 2 Sequence alignments of various spider silk sequences. AtMaSp2: *Argiope trifasciata* MaSp2 (NRN sequence: DQ059136, NRC sequence: AF350266), EaMaSp1: *Euprosthenops australis* MaSp1 (AM259067), LgMaSp1: *Latrodectus geometricus* MaSp1 (NRN sequence: DQ059133S1, NRC sequence: DQ059133S2), LhMaSp1: *Latrodectus hesperus* MaSp1 (EF595246), LhMaSp2: *L. hesperus* MaSp2 (EF595245), NiMaSp2: *Nepenthes inaurata madagascariensis* MaSp2 (NRN sequence: DQ059135, NRC sequence: AF350278), AbCySp1: *Argiope bruennichi* CySp1 (AB242144), AbCySp2: *A. bruennichi* CySp2 (AB242145), LhTuSp1: *L. hesperus* TuSp1 (NRN sequence: DQ379383, NRC sequence: AY953070), NiFlag: *N. i. madagascariensis* Flag (NRN sequence: AF218623S1, NRC sequence: AF218623S2), NcaCySp1: *Nephila clavata* CySp1 (NRN sequence: AB218974, NRC sequence: AB218973), NclFlag: *Nephila clavipes* Flag (NRN sequence: AF027972, NRC sequence: AF027973). (A) Consensus sequence of one repeating unit from different spidroins. (B) Sequence comparison of MaSp NRN and NRC domains from different species. Red: high sequence conservation (>50%), black: low sequence conservation. Con: Consensus sequence, where conserved residues in all sequences are indicated by capitals and residues with conservation of 50% or more in lowercase letters. The highly conserved cysteine residues are marked with a black arrow. (C) Sequence comparison of NRN and NRC domains from different species and spider silk proteins. Red: very high sequence conservation (>90%), black: high sequence conservation (>50%).

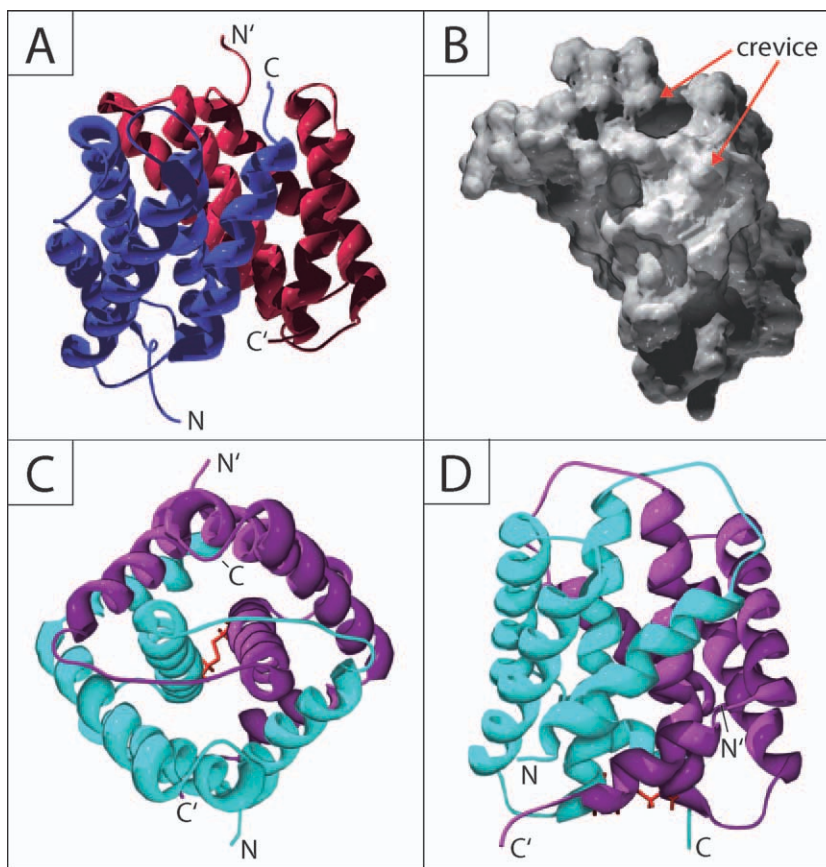


FIGURE 3 High resolution structures of both MaSp terminal domains. (A) NRN dimer from *Euprosthenois australis* MaSp1. The dimer is formed by two identical monomers (red and blue) in slightly twisted, antiparallel arrangement. Side chains are not shown for clarity. (B) NRN monomer from *E. australis* MaSp1. Monomeric NRN1 with calculated solvent accessible surface. The crevice is indicated by red arrows into which the linker region (to the repetitive core domain) possibly binds. (C) and (D) NRC dimer from *Araneus diadematus* ADF3. Two identical monomers (blue and magenta) form a parallel dimer. The molecule is shown from a top-view (C) and side-view (D). The intermolecular thiol bond is depicted in red.

120–130 amino acids, NRC-domains are always smaller with on average 87–110 amino acid residues.²² In comparison, NRN-domains seem to have a higher homology and similarity than NRC-domains,²² indicating a more conserved function for the amino-terminal region.

THE TERMINAL DOMAINS OF DRAGLINE SILK PROTEINS

The existence of highly conserved terminal domains in different silk types and species is a first indication of a highly important function. For longer period, it was not clear whether the non-repetitive terminal domains are actually present in any the mature protein fiber, but both immunological experiments using specific antibodies and mass-spectrometry analysis revealed at least the presence of the carboxy-terminal domains in mature fibers of different silk types.^{10,22–24} Since the two dragline silk spidroins, MaSp 1 and 2, have slightly

different amino acid sequences, specific antibodies were created against the individual NRC-domains. Using these antibodies, it was possible to visualize the non-homogeneous distribution of the two MaSp proteins within the fiber.²⁵ However, several results based on various sequence comparisons together with structural data of different silk types strongly indicate that the non-repetitive amino-terminal domain is also present in the mature fiber.^{20,22,26}

A significant step toward understanding the role of the terminal domains in storage and assembly was the determination of atomistic structures of the non-repetitive terminal regions of MaSp proteins. Interestingly, both terminal domains are mainly composed of unique α -helix-bundles but with different folds, neither of which have structural homologues so far.^{26–28}

The MaSp NRN domains from *Euprosthenois australis* and *Latrodectus hesperus* (black widow) consist of five α -heli-

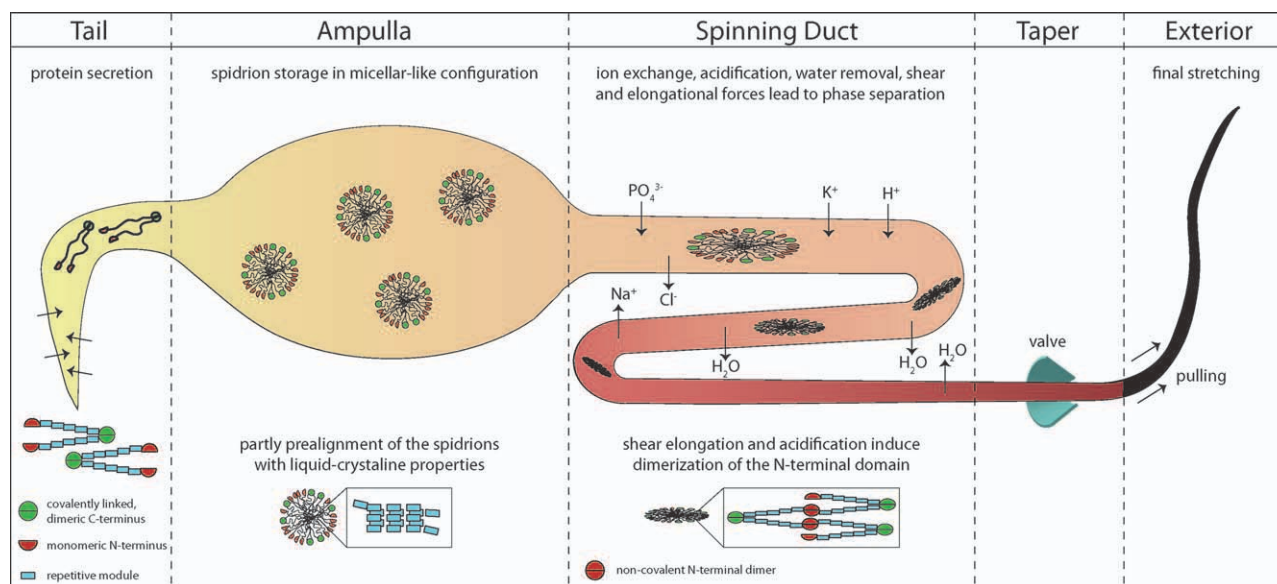


FIGURE 4 The natural spinning process of spider silk. Spidroins are produced and secreted in the tail of the spinning gland. The proteins are stored in the ampulla at concentrations of up to 50% (w/v). To prevent unspecific aggregation, the proteins likely form micellar-like structures. In the S-shaped spinning duct, the assembly process is initiated. Ion exchange, acidification and shear forces along the spinning duct induce a phase separation (the solid fiber is separated from aqueous solution). Before exiting the duct, the fiber passes the “valve,” which helps to reinitiate the spinning process after internal rupture of the fiber. Final stretching of the fibers is caused by pulling.

ces and are monomeric at pH 6.8 and above. On acidification they form tight, antiparallel dimers (Figures 3A and 3B). The dimer interface is mainly hydrophobic and conserved throughout different species and silk types.²⁶ The dimer reveals an interesting charge distribution with positive and negative charges clustering in opposite directions, forming a macromolecular dipole. Modeling experiments showed that this feature seems to be conserved in different NRN domains from different species and silk types. Another interesting feature of the dimeric form is a structurally conserved crevice located at the poles. The crystal structure of NRN of *E. australis* revealed that the linker region of one subunit connecting NRN with the repetitive core domain fits into this crevice, probably acting as a structural lock.²⁶

The NRC domain of the MaSp2 analog ADF3 (*Araneus diadematus* fibroin 3) from *A. diadematus* (European garden spider) also consists of five α -helices (Figure 3C). In contrast to the amino-terminal domain, the NRC region is a permanent, parallel dimer, covalently linked by a disulfide bond. The cysteine residue in each monomer is highly conserved within MaSp NRC domains (Figure 2B). The α -helices are arranged in a way that one helix of each monomer is domain swapped into the other monomer, forming a clamp-like structural arrangement.²⁷ Strikingly, the primary sequence of the NRC region is the most hydrophobic part of the known

ADF3 sequence, with all hydrophobic residues being buried within the dimer in its folded state. The solvent exposed surface shows an even distribution of hydrophilic patches ensuring the solubility of the domain.²⁷

MASP TERMINI SWITCH THEIR STRUCTURE UPON EXTERNAL TRIGGERS

To fully understand the properties of spider silk fibers, it is necessary to investigate the relationship between the structure of the mature fiber and the primary sequence of the underlying proteins. It is also important to understand the assembly process in which the spidroins are converted from a soluble structure into a solid fiber, taking only milliseconds or less at ambient temperatures (Figure 4).^{29,30} After secretion from the glandular cells, the major ampullate spidroins are stored in the ampulla at remarkably high concentrations of up to 50% (w/v) at approximately pH 7 and in the presence of sodium chloride.³¹ Under such storage conditions, micellar-like structures of the spidroins have been reported, likely presenting a metastable state to prevent undesirable aggregation.^{32–34} The assembly process is initiated in the tapered S-shaped spinning duct where sodium and chloride ions are exchanged for the more kosmotropic potassium and phosphate ions, accompanied by a reduction of the pH value to about 6.2. As shear forces increase along the duct, β -sheet

crystals form and align along the fiber axis. Recent results, supported by the atomic resolution structures of MaSp-termini (see above), indicate that both terminal domains act as environmentally triggered structural switches significantly influencing the solubility as well as the initiation of assembly.^{26–28,35}

Both MaSp1 amino-terminal regions, one from *Euprosthenops australis* and one from *L. hesperus* (black widow), are monomeric at storage conditions (pH 7 in presence of sodium chloride). In the complete absence of salt, the NRN domain has a slight tendency to dimerize, which is fully suppressed in the presence of 300 mM sodium chloride.^{28,36} The presence of the NRN domain in engineered, recombinant spider silk proteins decelerates the rate of aggregation by more than one order of magnitude, indicating a stabilizing role during storage.²⁶

Acidification to a pH below 6.4, which naturally occurs during the spinning process, induces the formation of a tight antiparallel NRN dimer, probably acting as an intermolecular crosslinker. This dimerization is completely reversible and strongly depends on two charged residues. One aspartic acid is highly conserved in all sequenced NRN-domains from different species and spidroins.²² Mutating this aspartic acid residue into its non-charged counterpart, asparagine prevents dimerization as observed by mass-spectrometry.³⁵ NRN further assembles into higher oligomeric structures as seen in light-scattering experiments, supporting the fact that NRN is critically involved in storage and assembly.²⁶

In contrast to NRN, the NRC domain is a covalently linked dimer with one intermolecular disulfide bond. In further contrast to the antiparallel dimer of the amino-terminal domain, the NRC domain reflects a parallel dimer, acting as a “clamp” to hold two spidroins together. Recombinant spidroins bearing the NRC domain are able to form supramolecular assemblies resembling micellar-like structures, depending on the spidroin concentration and the ionic strength of the solution. The presence of NRC seems to stabilize spidroins against phosphate induced aggregation.³⁷ Therefore, together with the NRN domain, NRC also plays an important role in storage.^{38,39}

Four charged residues per monomer in the NRC domain of ADF3 are the only charged residues in the entire known ADF3 sequence.¹⁸ These four charged residues form two intramolecular salt-bridges located at the junction of the terminal to the repetitive core domain. These residues play an important role in stabilizing the NRC dimeric structure. In presence of salt the structure of the dimer is stabilized. With decreasing ionic strength the structure surrounding the salt bridges becomes more flexible, exposing hydrophobic patches which can enhance the assembly process in the spinning duct.

In vitro it could be shown that the presence of NRC domains significantly influenced fiber assembly yielding even macroscopic fibers which could not be detected in absence of such

domain.^{40–42} This behaviour is even more pronounced in the presence of shear stress where recombinant spidroins with NRC assemble into millimeter-long fibers, while in the absence of the NRC domain only amorphous aggregation could be detected.^{27,39,43} The assembled fibers seem to consist of bundles of smaller fibrils ordered along the fiber axis. Intriguingly, β -sheet crystals formed by the polyalanine stretches are aligned along the axis of these fibers similar to their arrangement in the natural silk fiber.^{44,45} This finding indicates that in addition to its involvement in storage of the spidroins, the NRC domain also influences the pre-orientation of the structures of the repetitive core domain.

Combining structural information of both terminal domains with data from fibril assembly experiments, it is evident that both terminal domains contribute to the solubility of the spidroins under storage conditions, either by preventing unspecific aggregation or by facilitating the formation of micellar-like structures in the dope. Upon transfer of the dope to the spinning duct the environmental conditions change (including acidification, ion exchange, shear stress), influencing/changing the fold of the terminal domains. Under these altered conditions, both domains show a structural “switch.” In case of the amino-terminal domain, this results in a tight antiparallel dimer which acts as an intermolecular crosslinker facilitating the assembly process. The structural switch in NRC-domains, on the other hand, leads to exposition of hydrophobic patches which are able to enhance the assembly process and to direct spidroin alignment.

OUTLOOK

Small terminal domains are highly important for the assembly of structural proteins such as collagens or silks. Recent structural insights into termini of major ampullate spidroins indicate their involvement in both storage and assembly. One remaining question is concerning the contribution of the termini to the mechanical properties of the mature fiber.

Based on the first solved protein structures, it would be of interest to characterize further terminal domains of other silk types and silk from other spiders. Similarities or differences in their structure and function would deepen the understanding of the silk assembly process — a prerequisite of mimicking silk fiber assembly *in vitro*.

The authors thank Eileen Lintz for proof reading the article.

REFERENCES

1. Shoulders, M. D.; Raines, R. T. *Ann Rev Biochem* 2009, 78, 929–958.
2. Harrington, M. J.; Waite, J. H. In *Fibrous Proteins*; Scheibel, T. R., Ed.; Landes Bioscience: Austin, Texas, 2008; pp 30–45.

3. Waite, J. H.; Qin, X. X.; Coyne, K. J. *Matrix Biol* 1998, 17, 93–106.
4. Winkler, S.; Kaplan, D. L. *Rev Mol Biotechnol* 2000, 74, 85–93.
5. Hardy, J. G.; Romer, L. M.; Scheibel, T. R. *Polymer* 2008, 49, 4309–4327.
6. Eisoltdt, L.; Smith, A.; Scheibel, T. *Mater Today* 2011, 14, 80–86.
7. Heim, M.; Keerl, D.; Scheibel, T. *Angew Chem Int Ed* 2009, 48, 3584–3596.
8. Rising, A.; Widhe, M.; Johansson, J.; Hedhammar, M. *Cell Mol Life Sci* 2010, 1–16.
9. Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. *Science* 2010, 329, 528–531.
10. Sponner, A.; Unger, E.; Grosse, F.; Weisshart, K. *Biomacromolecules* 2004, 5, 840–845.
11. Denny, M. *J Exp Biol* 1976, 65, 483–506.
12. Blackledge, T. A.; Hayashi, C. Y. *J Exp Biol* 2006, 209, 2452–2461.
13. Vollrath, F. *J Biotechnol* 2000, 74, 67–83.
14. Madsen, B.; Shao, Z. Z.; Vollrath, F. *Int J Biol Macromol* 1999, 24, 301–306.
15. Hayashi, C. Y.; Blackledge, T. A.; Lewis, R. V. *Mol Biol Evol* 2004, 21, 1950–1959.
16. Ayoub, N. A.; Garb, J. E.; Tinghitella, R. M.; Collin, M. A.; Hayashi, C. Y. *Plos One* 2007, 2.
17. Hinman, M. B.; Lewis, R. V. *J Biol Chem* 1992, 267, 19320–19324.
18. Guerette, P. A.; Ginzinger, D. G.; Weber, B. H. F.; Gosline, J. M. *Science* 1996, 272, 112–115.
19. Motriuk-Smith, D.; Smith, A.; Hayashi, C. Y.; Lewis, R. V. *Biomacromolecules* 2005, 6, 3152–3159.
20. Rising, A.; Hjalms, G.; Engstrom, W.; Johansson, J. *Biomacromolecules* 2006, 7, 3120–3124.
21. Challis, R. J.; Goodacre, S. L.; Hewitt, G. M. *Insect Mol Biol* 2006, 15, 45–56.
22. Garb, J.; Ayoub, N.; Hayashi, C. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10, 243.
23. Hu, X. Y.; Kohler, K.; Falick, A. M.; Moore, A. M. F.; Jones, P. R.; Vierra, C. *Biochemistry* 2006, 45, 3506–3516.
24. La Mattina, C.; Reza, R.; Hu, X.; Falick, A. M.; Vasanthavada, K.; McNary, S.; Yee, R.; Vierra, C. A. *Biochemistry* 2008, 47, 4692–4700.
25. Sponner, A.; Unger, E.; Grosse, F.; Klaus, W. *Nat Mater* 2005, 4, 772–775.
26. Askarieh, G.; Hedhammar, M.; Nordling, K.; Saenz, A.; Casals, C.; Rising, A.; Johansson, J.; Knight, S. D. *Nature* 2010, 465, 236–U125.
27. Hagn, F.; Eisoltdt, L.; Hardy, J. G.; Vendrely, C.; Coles, M.; Scheibel, T.; Kessler, H. *Nature* 2010, 465, 239–242.
28. Hagn, F.; Thamm, C.; Scheibel, T.; Kessler, H. *Angew Chem Int Ed* 2010, 50, 310–313.
29. Hijirida, D. H.; Do, K. G.; Michal, C.; Wong, S.; Zax, D.; Jelin-ski, L. W. *Biophys J* 1996, 71, 3442–3447.
30. Vollrath, F.; Knight, D. P. *Nature* 2001, 410, 541–548.
31. Knight, D. P.; Vollrath, F. *Naturwissenschaften* 2001, 88, 179–182.
32. Jin, H. J.; Kaplan, D. L. *Nature* 2003, 424, 1057–1061.
33. Hu, X. Y.; Yuan, J.; Wang, X. D.; Vasanthavada, K.; Falick, A. M.; Jones, P. R.; La Mattina, C.; Vierra, C. A. *Biochemistry* 2007, 46, 3294–3303.
34. Knight, D. P.; Vollrath, F. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 1999, 266, 519–523.
35. Landreh, M.; Askarieh, G.; Nordling, K.; Hedhammar, M.; Rising, A.; Casals, C.; Astorga-Wells, J.; Alvelius, G.; Knight, S. D.; Johansson, J.; Jörnval, H.; Bergman, T. *J Mol Biol* 2010, 404, 328–336.
36. Gaines, W. A.; Sehorn, M. G.; Marcotte, W. R., Jr. *J Biol Chem* 2010, 285, 40745–40753.
37. Huemmerich, D.; Helsen, C. W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T. *Biochemistry* 2004, 43, 13604–13612.
38. Exler, J. H.; Hummerich, D.; Scheibel, T. *Angew Chem Int Ed* 2007, 46, 3559–3562.
39. Eisoltdt, L.; Hardy, J. G.; Heim, M.; Scheibel, T. R. *J Struct Biol* 2010, 170, 413–419.
40. Stark, M.; Grip, S.; Rising, A.; Hedhammar, M.; Engstrom, W.; Hjalms, G.; Johansson, J. *Biomacromolecules* 2007, 8, 1695–1701.
41. Sponner, A.; Vater, W.; Rommerskirch, W.; Vollrath, F.; Unger, E.; Grosse, F.; Weisshart, K. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 338, 897–902.
42. Hedhammar, M.; Rising, A.; Grip, S.; Martinez, A. S.; Nordling, K.; Casals, C.; Stark, M.; Johansson, J. *Biochemistry* 2008, 47, 3407–3417.
43. Rammensee, S.; Slotta, U.; Scheibel, T.; Bausch, A. R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105, 6590–6595.
44. Papadopoulos, P.; Ene, R.; Weidner, I.; Kremer, F. *Macromol Rapid Commun* 2009, 30, 851–857.
45. Papadopoulos, P.; Solter, J.; Kremer, F. *Colloid Polym Sci* 2009, 287, 231–236.

Reviewing Editor: David Nate Breslauer

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheibel, der es mir möglich machte, dieses spannende und herausfordernde Thema an seinem Lehrstuhl bearbeiten zu dürfen. Danke für das Vertrauen, die Unterstützung und einen gelegentlichen Motivationsschub zur rechten Zeit.

Ein herzliches Dankeschön, an alle, die mir bei der Durchführung oder Vorbereitung von Versuchen oder Datenauswertung zur Seite standen:

- Danke an Tamara Aigner für die Hilfe am FTIR und die TEM-Aufnahmen
- Danke an Hendrik Bargel und Claudia Stemmann für die REM-Aufnahmen
- Danke an Martin Humenik für die AFM-Aufnahmen, die MALDI-TOF Analysen und das Korrekturlesen dieser Arbeit
- Danke an Elise DeSimone für die Unterstützung am Rheometer

Bei Andreas Schmidt, Alexandra Pellert, Johannes Diehl und Eva Möller möchte ich mich für die Unterstützung im Laboralltag und bei Susanne Schramm, Andrea Bodner, Katja Weiner und Sabrina Raum für das Bewältigen von Problemen bürokratischer Art bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Bürokollegen Joschka Bauer, Christian Haynl, Adrian Golser, Kristin Schacht, Lukas Eisoldt, Hendrik Bargel, Andrew Smith, Michael Suhre und Jia Wang für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die wissenschaftlichen Diskussionen und das ein oder andere gemütliche Kännchen.

Allen alten und neuen Biomatlern (allen voran Andrew, Felix, Claudi, Anderl, Lukas, Markus, Joschi, Elena, Bruno, Heini) herzlichen Dank für die abwechslungs- und erlebnisreiche Zeit. Angefangen bei den Abenden im Triple-B, über das wöchentliche Fußballmatch oder jährliche Tauziehen bis hin zur unvergessenen Thanksgiving- und Weihnachtsfeiertradition werden mir viele Momente für immer in Erinnerung bleiben.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Geschwistern, Nichten und meiner lieben Oma für die Unterstützung und das Bestärken in vielfältigen Situationen, den vielen Spaß mit ihnen und ein allzeit offenes Ohr bedanken. Ganz besonders herzlichen Dank an meine Frau Sophia für die vielen Gesten und Worte der Unterstützung, die Aufmunterung und die vielen wertvollen Momente in dieser Zeit.

VERSICHERUNGEN UND ERKLÄRUNGEN

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

Ort, Datum, Unterschrift